

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI

Étude saisonnière de l'immunité cellulaire et humorale de
Mytilus edulis

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maitre ès sciences
dans le cadre du programme de maîtrise en océanographie

PAR
AMÉLIE JAUVIN

Juin 2012

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

Composition du jury :

Céline Audet, présidente du jury, UQAR-ISMER

Sophie Gauthier-Clerc, directrice de recherche, UQAR-ISMER

Jocelyne Pellerin, codirectrice de recherche, UQAR-ISMER

Michel Auffret, examinateur externe, Université de Bretagne Occidentale

Dépôt final le 29 juin 2012

REMERCIEMENTS

Je remercie mes directrices, Sophie Gauthier-Clerc et Jocelyne Pellerin, pour m'avoir accompagnée tout au long de mon cheminement vers cet aboutissement qu'est mon mémoire de maîtrise.

Merci également à Michel Auffret, pour le temps consacré en France à mon apprentissage des rudiments du marquage des hématocytes par les lectines et à son étudiante Audrey Bruneau pour son accueil.

Merci à Philippe Archambault pour ses conseils sur les tests statistiques.

Pour leur aide au laboratoire, je remercie également Pauline Brousseau, Michel Fournier, Marlène Fortier, Karine Lemarchand, Lucie Beaulieu, Isabelle Boily et Émilie Farcy. Merci aussi à Céline Audet, Émilien Pelletier, Nathalie Morin, Diane Bérubé, Andréanne Bernier, Charline Lemer, Pierre Rioux, Louiselle Lévesque et Steeven Ouellet.

Pour leur contribution financière, merci au CRSNG et à la SODIM.

Et finalement, merci à mes amies pour leurs corrections, leur support moral et leur aide précieuse : Élodie Rozoy, Matsanga Levesque-Kombila, Sahar Mejri, Cécile Renault, Claire Mourgues.

RÉSUMÉ

Ce travail avait pour objectif de décrire les variations temporelles de l'immunité cellulaire et humorale de la moule bleue, *Mytilus edulis*, élevée aux îles de la Madeleine. Les analyses ont eu lieu à différentes périodes de l'année, soit en octobre, en février et en mai. L'évaluation de l'immunité cellulaire par cytométrie en flux, comprenait des mesures de viabilité et de comptes cellulaires, de l'activité phagocytaire et de la flambée oxydative (production d'espèces réactives à l'oxygène : ROS) après stimulation par les LPS, le zymosan et des bêta glucans. Les ROS produits par la flambée oxydative peuvent engendrer des dommages cellulaires. Puisque différentes enzymes antioxydantes (catalase, superoxide dismutase et glutathion peroxidase) pourraient neutraliser les ROS pour protéger les composantes cellulaires, et donc indirectement limiter leur potentiel biocide, leurs activités ont également été mesurées. L'immunité humorale a été évaluée par la quantification de l'activité des enzymes phosphatase acide, prophenoloxydase et aminopeptidase. La mise au point d'une méthode permettant le suivi des deux principaux types cellulaires par l'utilisation de lectines fluorescentes a également été utilisée en février et en mai. Le résultat des analyses de l'immunité cellulaire montre une diminution significative des hémocytes circulants d'octobre à mai, mais une augmentation de la phagocytose indiquant une constance du nombre de cellules effectrices. Une importante variation saisonnière dans la production de réactifs d'oxygènes et d'oxydes nitreux a également été mesurée. Ces résultats suggèrent que, pour dresser un portrait complet de l'immunité cellulaire, il est essentiel de mesurer la phagocytose mais également la flambée oxydative et la production d'antioxydants intracellulaires. Le phénotypage des hémocytes avec les lectines SBA et PNA montre également une variation saisonnière dans la proportion des hyalinocytes par rapport aux granulocytes. Cette observation encourage la distinction des types cellulaires pour procéder à l'évaluation de l'immunocompétence puisque ces deux types cellulaires possèdent des capacités immunitaires différentes. Cette étude démontre la nécessité d'effectuer des études multiparamétriques du système immunitaire pour dresser un bon diagnostic de l'immunocompétence des bivalves.

Mots clés : Immunocompétence, *Mytilus edulis*, lectines, immunité cellulaire, immunité humorale, phagocytose, flambée oxydative, antioxydants, phénotypage cellulaire

ABSTRACT

The objective of the present work was to describe the seasonal variation of cellular and humoral immunity of the blue mussel, *Mytilus edulis* from the Magdalen Islands. Sampling was realized in October, February and May 2011. Cellular immunity was analysed by cytofluorometry and included measures of cell viability and counting, phagocytic capacity and oxidative burst (production of reactive oxygen species: ROS) with stimulation using LPS, zymosan and beta glucans. The ROS produced can generate cellular damage. Due to the ability of some antioxidants (catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase) to neutralize ROS, but also limit their biocide potential, their activity was measured. A protocol using the binding properties of fluorescent lectins was also developed as a way to determine the proportion of the two main cell types (hyalinocyte and granulocytes) within hemolymph of mussels sampled in February and May. Humoral immunity was assessed by quantification of the enzymes acid phosphatase, prophenoloxidase and aminopeptidase. The result of the analyses of cellular immunity mainly shows an important diminution in circulating hemocytes from October to May, but a rise in phagocytic activity, which indicates that the number of efficient cells remained stable. There was also an important seasonal variation in the production of reactive oxygen species and nitric oxide. These results demonstrate the need to measure phagocytosis in conjunction with oxidative burst and intracellular antioxidants to draw a complete picture of cellular immunity. Results using phenotyping by the lectins SBA and PNA also show seasonal variation in the proportion of hyalinocyte compared to granulocyte. Because these two cell types have different functions, this observation suggests that distinguishing hemocyte sub-populations should be taken into account while evaluating immunocompetency. This study demonstrates the need of multiparametric studies to evaluate the immunocompetency of bivalves.

Key words: immunocompetency, *Mytilus edulis*, lectins, cellular immunity, humoral immunity, phagocytosis, oxidative burst, antioxidants, cellular phenotyping

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	vii
RÉSUMÉ	ix
ABSTRACT	xi
TABLE DES MATIÈRES.....	xiii
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
LISTE DES FIGURES	xvii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xix
 INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	 1
 CHAPITRE 1	
VARIATION SAISONNIÈRE DE L'IMMUNITÉ CELLULAIRE ET HUMORALE DE LA MOULE BLEUE, <i>MYTILUS EDULIS</i>	 11
 1.0 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS.....	 11
1.1 INTRODUCTION.....	13
1.2 MATÉRIEL ET MÉTHODE	16
1.3 RÉSULTATS.....	24
1.4 DISCUSSION	36

CHAPITRE 2**PHÉNOTYPAGE DES HÉMOCYTES DE LA MOULE BLEUE, *MYTILUS******EDULIS* PAR L'UTILISATION DE LECTINES 43****2.0 RÉSUMÉ EN FRANÇAIS 43****2.1 INTRODUCTION 44****2.2 MATÉRIEL ET MÉTHODE 47****2.3 RÉSULTATS 52****2.4 DISCUSSION..... 60****DISCUSSION GÉNÉRALE 65****RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 71**

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 :

Table 1 : ROS production in hemocytes (in arbitrary units of fluorescence) after stimulation with LPS, Beta Glucans or Zymosan (values are mean \pm S.D., N=5).	27
Table 2 : Two-way ANOVA analysis of the effect of treatment, sampling period and their interaction (x) on the ROS production in hemocytes.	29
Table 3 : NOx production in hemocytes (in arbitrary units of fluorescence) after stimulation with LPS, Beta Glucans or Zymosan (values are mean \pm S.D., N=5).	30
Table 4 : Two-way ANOVA analysis of the effect of treatment, period and their interaction (x) on the production of NOx in hemocytes.	32

CHAPITRE 2 :

Tableau 5 : Pourcentages moyens d'inhibition spécifique du marquage des hémocytes avec la PNA, la SBA et la WGA.	54
--	----

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION :

Figure 1. Résumé de l'action des granulocytes lors d'une infection bactérienne.....	2
--	---

CHAPITRE 1 :

Figure 2. Localisation of the cultured site near Baie de Plaisance, Magdalen Islands	17
Figure 3. Gonado Somatic Index (GSI) from October 2010 to May 2011.	25
Figure 4. Phagocytic index (%) from October 2010 to May 2011.	26
Figure 5. ROS production in hemocytes stimulated with LPS, Beta Glucans or Zymosan expressed in percentage of control (without stimulation).	27
Figure 6. NOx production in hemocytes stimulated with LPS, Beta Glucans or Zymosan expressed in percentage of control (without stimulation).	30
Figure 7. a Catalase (CAT), b superoxide dismutase (SOD) and c glutathione peroxidase (GPx) activity in the hemolymph and hemocytes lysates from October 2010 to May 2011.....	33
Figure 8. a Acid phosphatase (AP), b proPhenoloxidase (proPO) and c leucine amino peptidase (LAP) activity in the hemolymph from October 2010 to May 2011.	35

CHAPITRE 2 :

- Figure 9.** Résultats bruts présentés par le logiciel de cytométrie en flux pour la quantification de l'autofluorescence (bruit de fond) des hémocytes. 49
- Figure 10.** Intensité (unité arbitraire de fluorescence) du marquage des hémocytes avec différentes concentrations de lectines..... 53
- Figure 11.** Intensité (en unité arbitraire de fluorescence U.A.) du marquage des hémocytes pour chaque lectine avec et sans inhibition spécifique. 54
- Figure 12.** Observation d'un champ d'hémocytes (x 20) marqués au Giemsa et avec la SBA **a** en lumière visible et **b** en fluorescence verte ainsi que d'un hémocyte isolé (x 40) marqué avec la SBA **c** en lumière visible et en fluorescence selon **d** un plan apical et **e** un plan basal 55
- Figure 13.** Analyse par la cytométrie en flux des hémocytes avec les lectines fluorescences. **a** un témoin marquage (autofluorescence des hémocytes) **b** fluorescence induite par la liaison de la SBA, **c** fluorescence induite par la liaison de la PNA et **d** fluorescence induite par la liaison de la WGA. 57
- Figure 14.** Pourcentage d'hyalinocytes et de granulocytes en fonction des résultats d'un marquage par les lectines SBA et PNA en février et mai 2011 58

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ANOVA	analyse de variance
AP	phosphatase acide
A.U.	pour unité arbitraire (arbitrary unit)
CAT	catalase
É.T.	écart type
FL-1	fluorescence-I dans le vert (532 -561 nm)
FSC-H	forward scatter – height
GPx	glutathion peroxydase
GSI	indice gonadosomatique
LAP	leucine aminopeptidase
LPS	lipopolysaccharides
NOx	oxydes nitreux.
PNA	agglutinine de l'arachide
ProPO	proPhenoloxydase
ROS	pour espèces réactives de l'oxygène (reactive oxygen species)
SBA	agglutinine du soya
S.D.	pour écart type (standard deviation)
SOD	superoxyde dismutase
SSC-H	Side scatter- height
U.A.	unité arbitraire
WGA	agglutinine des germes de blé

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Problématique

L'industrie maricole québécoise est en pleine expansion. L'« agriculture de la mer » est en effet de plus en plus florissante, rapportant plus de 600 M\$ au Canada en 2005 (CSMOPM et al., 2007). De ce montant, les élevages mytilicoles sont responsables de 33 M\$ de vente à eux seuls (CSMOPM et al., 2007). Cela dit, des épisodes de mortalités massives de bivalves sont parfois observés un peu partout dans le monde (Myrand et al., 2000; Beaz-Hidalgo et al., 2010; Yue et al., 2011). Ces mortalités inquiètent les mytiliculteurs puisqu'elles peuvent entraîner des pertes allant jusqu'à 80 % des élevages. Afin de mieux connaître les causes pouvant générer de telles mortalités, il convient d'étudier le système immunitaire des bivalves et ses faiblesses. Au Québec, les moules d'élevage appartiennent à l'espèce *Mytilus edulis*, également appelée moule bleue.

Le système immunitaire de la moule bleue

Comme chez tous les autres invertébrés, le système immunitaire des moules est inné, ce qui implique qu'il défend cette dernière contre les invasions bactériennes ou pathogéniques de manière instantanée chaque fois que l'une d'elles se produit. Il agit via l'activité de cellules spécialisées détectant les particules étrangères et via l'activité de composés humoraux, qui peuvent faciliter la détection des pathogènes, les agglutiner ou encore provoquer leur lyse (Figure 1).

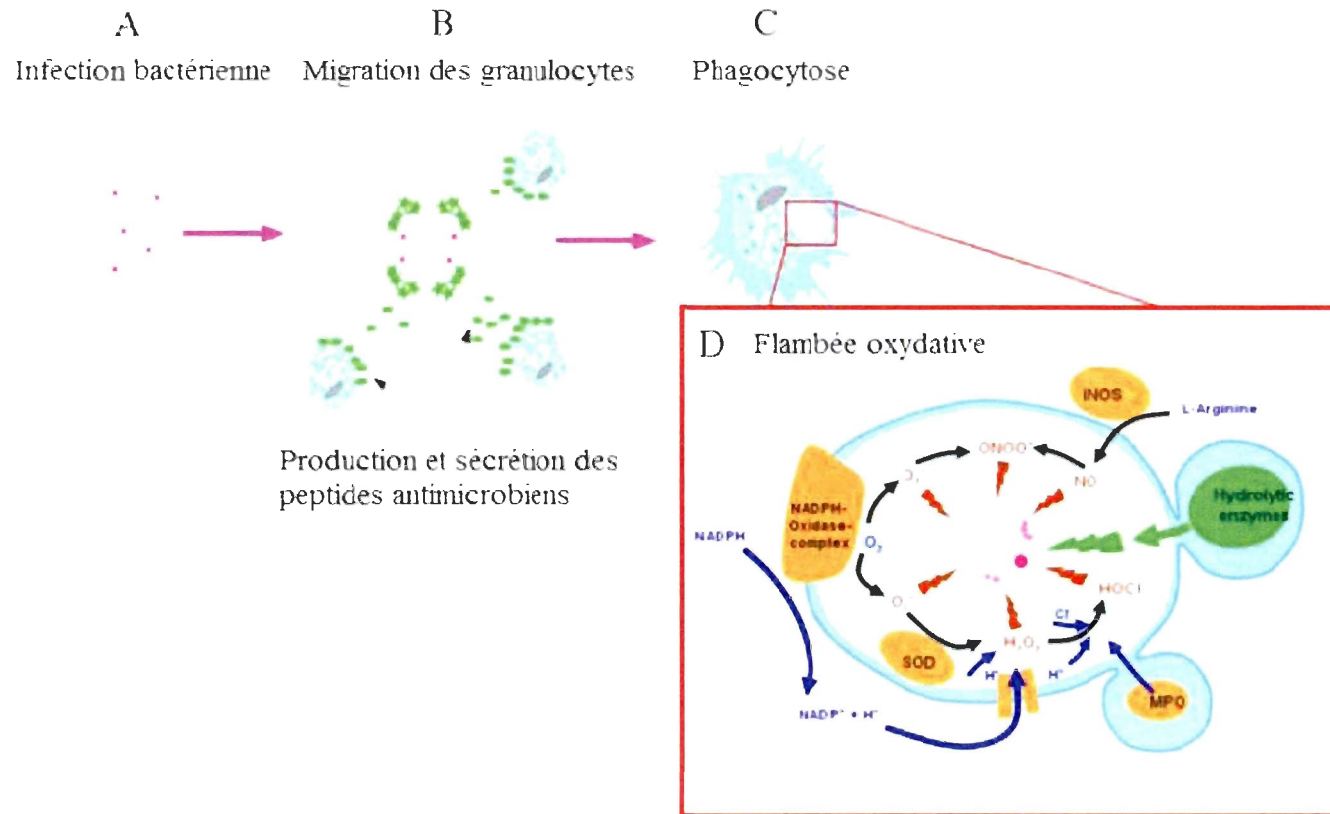


Figure 1. Résumé de l'action des granulocytes lors d'une infection bactérienne. La détection des bactéries entraîne (A) la migration des granulocytes vers le site de l'infection ainsi que la production et la sécrétion de peptides antimicrobiens, d'enzymes hydrolytiques etc. constituant l'immunité humorale (B). L'action des opsonines favorise la phagocytose des bactéries et leur internalisation (C). S'ensuit l'activation des voies impliquées dans la production des principaux composés de la flambée oxydative dans les phagosomes (D) (modifié de Donaghy et al., 2009).

Immunité cellulaire

Les cellules présentes dans l'hémolymphe qui jouent un rôle clé dans l'immunité sont appelées hémocytes. Leur observation a donné lieu par le passé à différents types de classifications, selon leur morphologie, leur fonctionnalité ou encore leur reconnaissance avec des anticorps monoclonaux (Noël et al., 1994). La littérature reconnaît généralement la présence de deux types cellulaires principaux dans l'hémolymphe de la moule bleue. Ces types cellulaires se différencient visuellement par leur granularité : les cellules agranulaires sont appelées hyalinocytes tandis que les cellules granulaires sont les granulocytes (Cheng, 1981). Pipe et al. (1997) ont effectué des séparations des hémocytes par des gradients de « Percoll », dont les trois couches montraient respectivement des cellules basophiles, un mélange basophile et éosinophile et une couche majoritairement éosinophile. Les hyalinocytes se trouvaient dans la première couche et les granulocytes dans la 2^e et la 3^e couche, la 2^e couche contenant majoritairement des cellules à petits granules que l'on peut considérer comme intermédiaires.

Les hémocytes effectuent la majeure partie de la réponse immunitaire face à une infection par des actions directes sur les particules étrangères. Parmi les fonctions remplies par les hémocytes, la phagocytose des particules étrangères est l'une des plus importantes pour la défense de l'organisme (Noël et al., 1994). La réponse phagocytaire est parfois différente selon la nature des particules étrangères, ce qui pourrait être relié à une différence dans les antigènes de surface présents et les différents mécanismes de détection des cellules (Bayne et al., 1979). La phagocytose est souvent observée au microscope à partir de 1 h seulement après l'ajout de particules, et se poursuit ensuite jusqu'à la saturation des cellules ou jusqu'au captage de toutes les particules, qui sont toujours observables dans les cellules après 14 heures (Bayne et al., 1979). Selon certaines recherches, la majorité des cellules phagocytaires chez les bivalves sont les granulocytes (Pipe et al., 1997). Mais comment ces cellules détectent-elles les corps étrangers?

Des protéines se liant de manière spécifique à des molécules de sucres, les lectines, pourraient jouer un rôle important dans ce mécanisme. La détection des lectines par des glycoprotéines à la surface des hémocytes entraînerait le chimiotactisme, c'est-à-dire la migration des hémocytes vers un corps étranger, suivi de son absorption par phagocytose (Cheng et al., 1995). Puisque ce sont les granulocytes qui effectuent davantage de phagocytose, ces cellules sont également les plus susceptibles de détecter une plus grande variété de lectines, possédant par nécessité un système de reconnaissance des particules étrangères plus sophistiqué (Pipe et al., 1997). Elles devraient donc avoir une plus grande variété de glycoprotéines sur leur paroi cellulaire. Les lectines sont également appelées agglutinines par leur capacité à coaguler des cellules sanguines à une dose déterminée (Renwrautz et al., 1985). Dans des protocoles permettant de suivre les particules détectées jusqu'à leur internalisation par les hémocytes, les particules de WGA « weat germ agglutinine » ont été détectées à l'intérieur des plus grosses granules des granulocytes, tandis que les particules de PNA « peanut agglutinine » présentaient plutôt une affinité pour l'hétérochromatine du noyau cellulaire (Pipe, 1990a). Ces différences pourraient faire état de chaînes de réactions distinctes et donc indiquer également des capacités cellulaires différentes déclenchées par la détection de ces particules.

Le contact avec des pathogènes déclenche une cascade de réactions dans les cellules immunitaires, dont l'activité d'une enzyme, la NAD(P)H-oxydase, qui provoque la production accrue de flambée oxydative (Roch, 1999; Husmann et al., 2011). La flambée oxydative comprend la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) et d'oxydes nitreux (NOx). Ce sont des composants très réactifs et toxiques pour les pathogènes. Ils ont majoritairement pour fonction de détruire les pathogènes phagocytés en réagissant avec leurs composantes cellulaires (Winston et al., 1996). Il est possible de stimuler cette production de flambée oxydative afin de vérifier la capacité des hémocytes à répondre efficacement à une infection bactérienne par l'usage de certaines substances, dont le zymozan, les lipopolysaccharides (LPS) ou les bêtas glucans (Roch, 1999 ; Costa et al., 2008; Costa et al., 2009). Ces produits sont des composantes isolées de parois cellulaires capables de déclencher la réponse immunitaire ainsi que des cascades protéolytiques

(Charlet et al, 1996). Le zymosan est un hydrate de carbone extrait de la paroi cellulaire des levures, tandis que les LPS sont extraits des bactéries Gram négatives et que les bêtas glucans sont des polysaccharides qui proviennent d'algues (Bettencourt et al., 2009). Ces composés peuvent être détectés par les hémocytes grâce à différents récepteurs cellulaires, et donc différentes cascades de réactions peuvent en résulter (Adema et al., 1991). Leur stimulation permet ainsi d'évaluer la capacité des réponses immunitaires contre des agents infectieux.

Un autre facteur important à considérer lors de la détection de la flambée oxydative est la génération d'antioxydants. En effet, les hémocytes peuvent empêcher les dommages associés à la production d'espèces chimiques réactives à l'oxygène (ROS) grâce à la production de certains antioxydants. La forte réactivité des ROS peut mener à la formation de composés toxiques comme les aldéhydes et à l'attaque des membranes lipidiques ou des acides nucléiques par les radicaux libres (Michiels et Remacle., 1988). Pipe et al. (1993) ont procédé à la localisation de quelques antioxydants dans les hémocytes de *Mytilus edulis*, dont la superoxyde dismutase (SOD), le glutathion peroxydase (GPx) ainsi que l'enzyme catalase (CAT). Les granulocytes qu'il a observés contenaient tous les antioxydants mesurés, tandis que seule la SOD a été localisée dans les hyalinocytes. La catalase a été trouvée dans les petits granules des granulocytes identifiés comme des peroxysomes. La SOD a également été trouvée dans des granules autrement appelés lysosomes. La CAT et la SOD n'ont pas été détectées dans l'hémolymph tandis qu'au contraire, la GPx y a été majoritairement trouvée sous sa forme libre. Des tests effectués par Michiels et Remacle (1988) sur l'inhibition de ses enzymes ont révélé une diminution de la viabilité cellulaire. Ces résultats confirment l'importance de ces agents antioxydants dans la prévention de dommages engendrés par les radicaux libres et la pertinence du suivi de leur production dans le cadre d'une étude sur l'activité du système immunitaire des bivalves.

Immunité humorale

L'immunité humorale des bivalves comprend surtout des peptides antimicrobiens, des enzymes hydrolytiques, des exopeptidases ou des agglutinines (Chu, 1988). Ces substances sont majoritairement produites dans les granulocytes et libérées dans l'hémolymphes lors de l'infection. Les peptides antimicrobiens peuvent agir comme bactéricides à différentes étapes de l'infection bactérienne et contre différents types de bactéries (Mitta et al., 1999). Très diversifiés, généralement de petite taille et cationiques, certains d'entre eux ont également un effet fongicide (Charlet et al., 1996). Les agglutinines ont la capacité de créer des liaisons non covalentes avec des glycoprotéines de surfaces sur les cellules qui peuvent provoquer leur agglutination. Les enzymes hydrolytiques catalysent des molécules par des réactions impliquant la lyse d'une molécule d'eau (Chu, 1988; de Almeida et al., 2007). La libération d'enzymes lysosomales par les hémocytes est, avec la production de ROS et NOx, un mécanisme essentiel pour lyser les pathogènes (Pipe, 1990b).

Parmi les activités enzymatiques d'intérêt pour l'immunité des bivalves, l'enzyme hydrolytique lysosomale phosphatase acide a été détectée dans des granules présents dans tous les granulocytes et dans certains hyalinocytes de *Mytilus galloprovincialis* (Carballal et al., 1997). Sa présence dans les hémocytes de *Mytilus edulis* est donc très probable. Puis, la leucine aminopeptidase est une protéase sérique capable de lyser les protéines et les peptides en coupant la portion aminoterminal au niveau de la leucine (Donald et al., 2003; Matsui et al., 2006). Elle est reconnue pour son implication dans la régulation de la production d'O₂⁻ et fait partie du processus d'adhésion cellulaire nécessaire à l'encapsulation des particules étrangères (Renwanz et al., 2009). Finalement, la proPhénoloxydase fait probablement également partie du système de défense de *Mytilus edulis* puisque son activité augmente dans le cas d'infections bactériennes et de parasitisme léger à modéré chez plusieurs arthropodes et bivalves (Carballal et al., 1997a; Hong et al., 2006). Notons aussi que son activité peut aussi être stimulée lors d'une blessure physique (Matsui et al., 2006) et que différentes études ont montré chez plusieurs bivalves qu'il pourrait s'agir d'une forme précurseur de la phénoloxydase, d'abord synthétisée sous cette

forme inactive mais potentiellement activée par un éliciteur qui pourrait être endogène ou encore exogène (Coles et Pipe, 1994).

Variation saisonnière de l'immunocompétence

L'un des aspects très important, mais souvent négligé lors de recherches sur les bivalves, est la variation temporelle de l'immunocompétence. Par exemple, l'activité des hémocytes de *Mytilus galloprovincialis* présente une importante variation saisonnière, notamment par leur production d'oxyde nitreux et leur quantité de récepteurs d'Interleukine-2 (Cao et al., 2007). Les capacités immunitaires de la moule peuvent être modulées par de nombreux facteurs environnementaux, tant biotiques qu'abiotiques.

Parmi les facteurs abiotiques, la température et la salinité peuvent moduler le métabolisme et la réponse immunitaire de *Mytilus edulis* (Bussell et al., 2008). Chez l'huître par exemple, une augmentation soudaine de la température de l'eau de quelques degrés Celsius pendant une semaine peut avoir pour effet de diminuer la taille des hémocytes et leur capacité phagocytaire (Hégaret et al., 2003a; b). Bien que les bivalves soient des espèces capables de s'adapter à des variations importantes de température et de salinité, leurs hémocytes ont une activité plus stable avec une salinité d'environ 28‰ et une température autour de 15 °C, en se basant sur des observations de Hauton et al. (1998) pour *Ostrea edulis*.

Parmi les facteurs biotiques, le cycle reproducteur est un facteur physiologique clé qui engendre une variation saisonnière de l'immunité, car la gamétogénèse et la libération des gamètes demandent beaucoup d'énergie. Lemaire et al. (2006) ont d'ailleurs observé une baisse de la capacité phagocytaire, chez *Mytilus edulis* au Québec après la ponte.

La disponibilité du phytoplancton comme source de nourriture peut également affecter grandement la quantité d'hémocytes présents dans l'hémolymphe (Carballal et al., 1998) et leur activité (Delaporte et al., 2006). La qualité de la nourriture est également importante, puisque la richesse en acide gras de l'alimentation influence directement la proportion que les hémocytes contiennent, ce qui leur confère une plus grande stabilité

(Delaporte et al., 2003). La nourriture disponible peut donc constituer un facteur important, puisqu'il est nécessaire d'avoir une nourriture suffisamment abondante pour subvenir aux besoins de la moule tant pour le cycle reproducteur que pour la défense de l'organisme.

Contexte de l'étude

Les moules du Québec vivent dans un environnement particulier puisque la côte Atlantique du Canada présente une très grande variation de température annuelle. En effet, durant une période d'environ 8 mois, la température de l'eau descend sous les 10°C et peut parfois monter au-delà de 20°C en été. Ces variations dictent en partie la période de reproduction des bivalves et pourraient également moduler leur capacité immunitaire. Certaines moules des îles de la Madeleine ont été victimes d'épisodes de mortalités estivales, mais certaines populations en sont exemptes (Myrand et al., 2000). Les aquaculteurs de cette région utilisent la culture en suspension à l'intérieur des lagunes et au large dans la baie de Plaisance. La baie de Plaisance est particulièrement d'intérêt, car celle-ci présente une zone éloignée des rejets urbains et des activités anthropiques qui pourraient influencer des études du système immunitaire. Les moules de la baie de Plaisance pondent en général une seule fois à la mi-juillet, ce qui est plutôt tardif comparé à d'autres sites de culture (Gauthier-Clerc et al., 2007). Occasionnellement, des pontes tardives peuvent se produire de manière opportuniste lorsque la nourriture est abondante ou à l'inverse, lorsque les conditions environnementales sont stressantes. Il peut également se produire des pontes partielles, réduisant les coûts énergétiques de la reproduction, avec ou sans résorption des gamètes non pondues (Myrand, 1999). Cette population est néanmoins considérée comme en santé et constitue une population idéale pour l'étude de l'effet du cycle reproducteur et des facteurs environnementaux sur le système immunitaire.

Objectif général

L'objectif général de cette recherche consiste à décrire les variations temporelles de l'immunité cellulaire et humorale de *Mytilus edulis* élevée aux îles de la Madeleine.

Objectifs spécifiques

- Évaluer la variation saisonnière des comptes cellulaires ainsi que des fonctions cellulaires de phagocytose et la flambée oxydative (par une stimulation aux LPS, aux bêta glucans et aux particules de zymozan).
- Mesurer pour chaque période l'activité de trois enzymes antioxydantes : catalase, superoxyde dismutase et glutathion peroxydase.
- Déterminer l'activité saisonnière de trois enzymes hydrolytiques de l'immunité humorale : phosphatase acide, phenoloxydase avec son précurseur prophenoloxydase et leucine aminopeptidase.
- Différencier les populations d'hémocytes grâce à la présence de sites membranaires capables de reconnaître les lectines.
- Vérifier la variation saisonnière des populations d'hémocytes par le marquage des lectines.

Hypothèses

L'étude de l'immunité cellulaire permettra de vérifier si la capacité phagocytaire et la flambée oxydative varient selon la période de l'année avec une activité plus faible lorsque la gamétogénèse est plus active. Le nombre d'hémocytes pourrait aussi diminuer durant la gamétogénèse puisque les hémocytes sont alors recrutés vers le manteau pour répondre aux besoins énergétiques des gamètes en développement. Les hypothèses selon lesquelles la production de ROS et de NOx varie selon le type de stimulant et le temps seront également vérifiées, puisque différents mécanismes d'activation peuvent être induits et que la disponibilité énergétique peut être différente durant la gamétogénèse. Concernant

l'immunité humorale, il est attendu que l'activité des enzymes hydrolytiques varie avec le temps pour être plus importante juste avant la reproduction. Le marquage aux lectines devrait permettre de différencier les granulocytes des hyalinocytes, et la population de ces cellules devrait être différente au printemps, alors que des différences dans la migration des types cellulaires vers le manteau pourraient se produire.

CHAPITRE 1 :

VARIATION SAISONNIERE DE L'IMMUNITE CELLULAIRE ET HUMORALE DE LA MOULE BLEUE, *MYTILUS EDULIS*

1.0. Résumé

L'immunocompétence de moules bleues, *Mytilus edulis* provenant de la baie de Plaisance aux îles de la Madeleine (Golfe du St-Laurent), a été étudiée en octobre et en février 2010 et en mai 2011. L'immunité cellulaire, analysée par cytométrie en flux, a permis de déterminer le nombre d'hémocytes circulants, leur capacité phagocytaire et la flambée oxydative (production d'espèces réactives à l'oxygène : ROS) après stimulation par les LPS, le zymosan et des bêta glucans. Les ROS produits par la flambée oxydative peuvent engendrer des dommages cellulaires. Puisque les activités de différentes enzymes antioxydantes (catalase, superoxide dismutase et glutathion peroxidase) pourraient les neutraliser, et donc indirectement limiter leur potentiel biocide, elles ont également été mesurées. L'immunité humorale a été évaluée par la quantification de l'activité des enzymes phosphatase acide, prophenoloxydase et aminopeptidase. Le résultat des analyses de l'immunité cellulaire montre une diminution significative du nombre d'hémocytes circulants d'octobre à mai, mais une augmentation de la phagocytose indiquant une constance du nombre de cellules effectrices. Une importante variation saisonnière dans la production de réactifs d'oxygènes et d'oxydes nitreux a également été mesurée. Ces résultats suggèrent que, pour dresser un portrait complet de l'immunité cellulaire, il est essentiel de mesurer la phagocytose mais également la flambée oxydative et la production d'antioxydants intracellulaires. Cette étude démontre la nécessité d'effectuer des études multiparamétriques du système immunitaire pour dresser un bon diagnostic de l'immunocompétence des bivalves.

Mots clés : moule bleue, *Mytilus edulis*, saisonnier, immunité cellulaire, immunité humorale, antioxydants, phagocytose, réactifs d'oxygène, oxydes nitreux, aquaculture.

Contexte du projet

Ce premier article fut corédigé par moi-même ainsi que par le Dr Sophie Gauthier-Clerc. Le Dr Jocelyne Pellerin a également contribué à sa révision. En tant que premier auteur, ma contribution à ce travail fut l'essentiel de la recherche, l'exécution des analyses et la rédaction de l'article. Une version de cet article sera également préparée en vue de publication.

Seasonal variation of the cellular and humoral immunity
of the blue mussel, *Mytilus edulis*

The immunocompetency of the blue mussel, *Mytilus edulis*, was evaluated at three different periods of the year, during the months of October, February, and May. Mussels from Baie de Plaisance, Magdalen Islands (Gulf of Saint Lawrence) were used because of their high capacity to resist massive mortalities. The cellular immunity, analysed by cytofluorometry, included measures of cell count, phagocytic index and oxidative burst (production of reactive oxygen species: ROS) with stimulation using LPS, zymosan and beta glucans. The ROS produced can generate cellular damage. Due to the ability of some antioxidants (catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase) to neutralize ROS, which would limit their biocide potential, their activity was also measured. Humoral immunity was tested by quantification of the enzymes, acid phosphatase, prophenoloxidase and aminopeptidase. The result of the analyses of cellular immunity mainly shows an important diminution in circulating hemocytes from October to May, but a rise in phagocytic activity, which indicates that the number of efficient cells remained stable. There was also an important seasonal variation in the production of reactive oxygen species and nitric oxide. These results show that phagocytosis should be measured in conjunction with oxidative burst and intracellular antioxidants to draw a complete picture of cellular immunity. This study demonstrates the need of multiparametric studies to evaluate the immunocompetency of bivalves.

Key words: blue mussel, *Mytilus edulis*, seasonal, cellular immunity, humoral immunity, phagocytosis, antioxidants, reactive oxygen species, nitric oxides, aquaculture.

1.1. Introduction

The culture of bivalves is a flourishing industry in the coastline of many countries in the world. There is however a widespread concern among farmers that mass mortalities recorded for bivalves in the past could be due to a recurring virulent *Vibrio* species capable of seriously impacting their harvest (Beaz-Hidalgo et al., 2010; Yue et al., 2011). The immunocompetency potentially preventing this outcome is thought to be fluctuating according to seasonal environmental factors, resulting in increased vulnerability (Cao et al., 2007, Santarem et al., 1994). The reproductive cycle and environmental parameters are some of the most important factors responsible for this variation (Pipe et al., 1995; Fisher et al., 1989 ; Lemaire et al., 2006; Hernroth, 2003). The blue mussel, *Mytilus edulis*, is the main species cultured in Canada, renowned for its cold climate with water temperatures as low as -2°C for more than 3 months in winter (Environment Canada, pers. comm.). With climate change, the distribution of pathogens could transfer toward northern regions which are for now less exposed to pathogens. Monitoring seasonal variation of immunity would therefore be important in a region like eastern Quebec, where some mussels populations appear to be vulnerable to several stress related factors (Myrand et al., 2000).

Mussels only have innate immunity, comprising cellular and humoral effectors to quickly and efficiently limit an infection (Feng, 1988). The cellular immunity is carried out by cells called hemocytes and the main cell type are granulocytes which are considered to be the most efficient at phagocytosis (Cheng, 1981). These cells engulf foreign particles and destroy them using various subsequent means, including the production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NOx) inside the lysosomes (Franchini et al., 1995; Arumugam et al., 2000). The production of ROS can be induced via a signalling pathway stimulated by molecules from the cell wall of bacteria, like lipopolysaccharide (major component of gram negative bacteria's cell wall) or zymosan (a carbohydrate from the cell wall of yeast) (Bettencourt et al., 2009). These molecules can be attracted to different ligands of hemocyte surface and therefore, differences can be detected in the mechanisms triggered within mussel's hemocytes upon their detection (Adema et al., 1991). Some

antioxidants are thought to modulate the highly reactive oxygen compounds after their production to prevent damage to the organism (Campa-Córdova et al., 2002). The presence of catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase has been previously reported in the hemolymph or in the hemocytes (Pipe, 1993). On the other hand, humoral immunity encompasses all the free enzymes or proteins involved in defending the organism against foreign material, most of them acting as foreign cell lysates, antimicrobial factors, agglutinins and peptidases (Chu, 1988). The source of these enzymes is mainly the cytoplasmic granules of the hemocytes and they are released into the hemolymph upon stimulation of the hemocytes (Feng, 1988). Among these enzymes, Leucine aminopeptidase is of interest because of its involvement in regulation of O_2^- production and in the cell adhesion process needed for encapsulation (Renwrautz et al., 2009). The acid phosphatase is a also lysosomal enzyme capable of killing pathogens by hydrolase (Cheng and Downs, 1988). Phenoloxidase, which is involved in encapsulation and melanisation of foreign bodies, is hypothesized to be synthesized in some bivalve species as inactive prophenoloxidase before being activated by a system that can be either endogenous or exogenous (Coles and Pipe, 1994). Therefore, the entire process of immunity is very complex and tightly entangled. The assessment of both cellular and humoral immunity would therefore provide the best assessment of the capability to neutralise pathogens in marine mussels.

This study aims to quantify both cellular and humoral immunological parameters of the marine mussel *Mytilus edulis* cultivated in Quebec throughout different periods of the year. The use of cultured mussels from farming areas located away from coastline, and therefore from any source of contaminants that may affect the immune system, will also provide a point of comparison for subsequent studies in the North Atlantic coastline of Canada. The cellular immunity will be assessed using flow cytometry, which is a technique that will allow an efficient analysis of individual cells to assess their viability, phagocytic capacity and the production of ROS and NOx (Brousseau et al., 2000; Marrone, 2009). The activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) will also be quantified in hemocyte lysates and hemolymph. To assess the humoral

immunity, we selected the enzymes leucine aminopeptidase, phenoloxidase, prophenoloxidase and acid phosphatase.

1.2. Material and Methods

Mussels

Long-line cultured mussels (mean size = 63 mm; N=80) were collected in October 2010, February 2011 and May 2011 in Baie de Plaisance in Magdalen Islands (47°22'6.30"N, 61°44'56.22"W, see figure 2). The site is located about 5 kilometers from the coast and remote from sewage output or harbour activities. Upon arrival at the Institut des Sciences de la mer de Rimouski, mussels were maintained in aquaria containing aerated saltwater (28 ppm; 80% Oxygen; UV disinfected) to recover from the 24 hours of transportation. The temperature was adjusted to be similar to the field: 9°C in October, 3°C in February and 5°C in May. No other manipulation occurred before analysis.

Gonado somatic index (dry weight of gonadic tissue / total dry weight of flesh) was calculated for 15 mussels of each sampling period to assess their reproductive status.

Hemolymph collection

Punctures were made by gently opening the mussels with surgical scissors and insertion of a 23G needle in the posterior adductor muscle. Syringe was filled very slowly to prevent cell damage. Hemolymph was filtered through 80 µm mesh to eliminate aggregates or potential large debris for further analysis by flow cytometry. To reduce individual variation and to provide hemolymph for all protocols, five pools (each composed of 7 individuals) were used to assess cellular and humoral immunity. For the determination of humoral parameters, an aliquot of each pool was gently centrifuged (500g, 10 min) to isolate the hemocytes from the supernatant (plasma). For analysis of antioxidant biomarkers in both hemocytes and plasma, two additional pools each prepared from 15

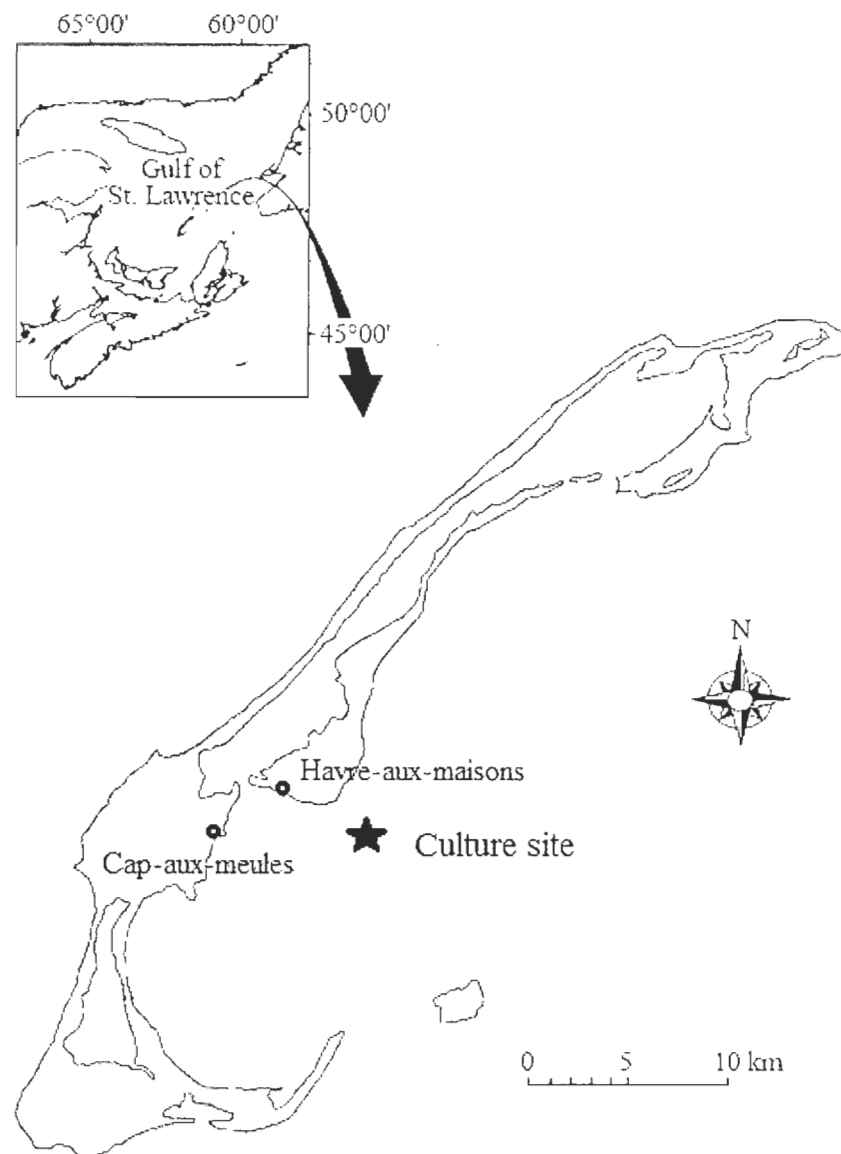


Figure 2. Localisation of the cultured site near Baie de Plaisance, Magdalen Islands.
The site is approximately at 7.2 km from the dock of Cap-aux-Meules and 4km from Havre-aux-Maisons.

mussels were centrifuged (500g, 10 min) to separate the cells and the plasma. Samples for humoral parameters and antioxidants measurements were stored at -80°C until analysis.

Cellular immunity

Hemocyte analysis by flow cytometry

All cellular analyses were done with a Flow cytometer FACSCAN (Becton, Dickinson) using the CellQuest Software (Becton, Dickinson). A minimum of 8000 events were recorded for each analysis. To characterize the hemocytes and disregard debris during cell analysis, a sample was incubated with SYBR Green (Invitrogen 559657) a RNA/DNA specific and fluorescent dye which permeates dead and live cells. The commercial solution of SYBR green was diluted with Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma D8418) 1:10 and added to samples (1:100) for a 10 minutes incubation in the dark. Then hemocytes were visualized on the cytogram plotting Side Scatter height (SSC-H related to cell complexity) versus Forward Scatter height (FSC-H related to cell size) and could undoubtedly be discriminated from debris by their high nuclear content measurable by the FLI detector. The voltage settings of the flow cytometer as well as the gate on the cytogram specific to the hemocytes were saved and subsequently used for all further analysis of cellular fluorescence.

Cell counts

Cell counts were done using known cytometer's high flow rate and counting all gated events (see above) for 90 seconds as described by Duchemin et al. (2008).

Viability assessment

Each sample was analysed using Propidium Iodine (PI; Sigma P4170) according to Fournier et al. (2001). PI is a fluorescent DNA/RNA-specific dye that only permeates dead cells. A final concentration of 10 µg/ml PI was added to 200 µL of each pool. The PI

fluorescence was measured in cell by the FL2 detector of the flow cytometer and the percentage of viable cells was calculated by deducting the percentage of dead cells detected by their fluorescence.

Phagocytic Index

Protocol was adapted from Duchemin et al. (2008) using Yellow Green latex FluoSpheres (Floresbrite YG 1.71 μ m diameter). A ratio of 30 beads per cells (30:1) were added to each samples placed in wells of a microplate gently centrifuged (300 g, 5 min.) before a 3-hour incubation in the dark. The supernatant was then discarded and the pellet was resuspended in a fixative solution composed of 0.2% sodium azide (S8032) and 0.5% formaldehyde. Results are expressed as phagocytic index, which is the relative percentage of efficient hemocytes having engulfed at least three beads. Percentage of cells having beads adhered to the cell walls without phagocytosis was evaluated by a 2 hour preincubation of a sample into 2% sodium azide according to Delaporte et al. (2003).

Reactive Oxygen species (ROS) and Nitrous Oxides (NOx) production

Production of ROS and NOx was detected with specific molecular probes getting fluorescent in presence of ROS or NOx. DCFDA probe (Sigma 21884 in October and Invitrogen C400 in February and May because of technical problems) detects the ROS production and DAF-FM probe (Invitrogen D1821) is used to evaluate NOx production. Fluorescence was detected by the FL-1 detector of the cytometer. The final dilution of both probes was 10 μ M with a stock solution prepared with 1:10 DMSO. Stimulation of ROS and NOx production was promoted with Lipopolysaccharides (LPS) (Sigma L2880), B-Glucan (Sigma L9634) or Zymosan (Sigma Z4250). Samples were exposed for 2 hours in the dark to 10 μ g/ml LPS, 10 μ g/ml B-Glucans or to 30 particles of Zymosan/cell, all diluted in filtered sea water (FSW). A control without stimulation was also made by omitting the stimulant before the incubation with each probe. Cytometer's settings were saved and reused to ensure a constant sensitivity to quantify cell fluorescence (FL1 was 607 for ROS and 533 for NOx). However, in October, samples for the ROS cannot be compared

to those from February and May since a different probe was used to detect them, as previously mentioned. The ROS and NOx production were expressed in arbitrary unit of fluorescence (A.U.). For graphical representation, results were expressed for each pool as a percentage of the fluorescence observed in comparison to the control (unstimulated) value (mean \pm S.D.).

Antioxidants

To perform the analysis of antioxidants capacity on the cytosolic fraction of hemocytes, each pool was sonicated for 30 minutes at 4°C and centrifugated at 12000 g for 10 min to collect the lysate. Proteins of all samples were also determined by the method of Bradford (1976) as previously described to express the enzymatic activities per mg of protein.

Catalase (CAT)

Catalase activity was assayed by the decomposition of H₂O₂ at 240 nm (extinction coefficient = 40 nm x M⁻¹ x cm⁻¹) according to the method of Aebi (1984). The buffer solution for this experiment was 50 mM pH 7.0 phosphate buffer and the solution of H₂O₂ was prepared extemporaneously. Measurements were done for 3 minutes at upon addition of the sample to H₂O₂ (final concentration of 40 mM) in the cuvette. The catalase activity was expressed in terms of mole of H₂O₂ consumed /minute /mg of protein.

Superoxide dismutase (SOD)

The method is based on the ability of SOD to inhibit the oxidation of hypoxanthine by xanthine oxidase (McCord and Fridovich., 1969). The substrate's buffer was made by adding 0.1mM EDTA (Sigma, ED2SS), 10 μ M cytochrome *c* (Sigma, C2506) and 50 μ M hypoxanthine (Sigma, H9377) to a 50 mM pH 7.8 phosphate buffer. Reaction was initiated by adding a final concentration of 5.7 mU of Xanthine Oxidase (Sigma, X1875). Basal reduction of cytochrome *c* by oxidation of hypoxanthine was determined by using

phosphate buffer instead of sample. Assessment of absorbance variation due to cytochrome *c* reduction by the sample was also determined by omitting Xanthine Oxidase for the assay. Readings were done at 550 nm for 3 minutes. One arbitrary unit (U) of SOD is considered to inhibit 50% of cytochrome *c* reduction. Results are expressed per mg of proteins.

Glutathione peroxidase (GPx)

Assays were run as described in Livingstone et al. (1992) to determine the activity of the total GPx (sum of selenium (Se)-dependant and se-independant) by the oxidation of NADPH using cumene hydroperoxydase (CHP) as substrate. The substrate buffer for the reaction is composed of a final concentration of 1.6 mM GSH (G4251), 0.8 mM NaN_3 (Sigma S8032), 0.096 mM NADPH (Sigma, N1630), 0.8 mM EDTA (Sigma ED2SS) and 0.8 U glutathione reductase (Sigma G3664). Reaction was started by adding CHP (Sigma 247502) at a final concentration of 0.5 mM. To determine the decrease of absorbance due to spontaneous oxidation of NADPH, measurements were done by replacing the sample by phosphate buffer during the assay. Controls were also done for each sample by replacing CHP by phosphate buffer to determine the background oxidation of NADPH due to enzyme activities present in the sample but different from the GPx. Readings were done for 3 minutes at 340 nm (NADH extinction coefficient = $6.22 \text{ m M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). GPx activity was calculated from the difference in rates of assays in the presence and absence of sample and expressed in terms of moles of NADPH oxidized /minute /mg of protein.

Humoral Immunity

Proteins

The protocol was modified partly from the method of Bradford (1976) and samples were first treated according to Somero and Childress (1990) to solubilize proteins. We used a Coomassie brilliant blue G-250 (Biorad 161-0786) diluted 1:5 in distilled water as a reagent and Bovine Serum Albumin (BSA) as standard (Sigma A1503). Absorbance was read at 595 nm after 5 minutes. Quantification of proteins was expressed in mg/ml.

Acid Phosphatase

Method was modified from Hong et al. (2006). A solution of P-Nitrophenol (Sigma 1048) in acetic buffer (20 mM, pH 5.0) was used to prepare a standard curve. The reaction was initiated by adding 12mM 4-nitrophenylphosphate solution (Sigma 71768) to the samples for 1 hour of agitation at 37°C. NaOH 1N was then added to allow coloration and the plate was read immediately at 405 nm. Since activity of Acid phosphatase is proportional to Nitrophenol produced by the reaction, the phosphatase activity was expressed in nmol Nitrophenol/mg protein.

Phenol Oxidase and Pro-phenol Oxidase-like

The protocol was modified from Munoz et al. (2006). 10µl of pure samples were diluted in 40µL of buffer (PBS 1X pH 7.4). Samples were incubated with a final concentration of 0.1 mg/ml of SDS as an elicitor (Sigma L3771) solution for 30 minutes at 37°C in constant agitation. To measure the pro-phenol oxidase-like (proPO) activity, 50 µL of a substrate solution containing 3 mg/mL L-DOPA (Sigma D9628) in 0.2 M HCl with 10 mM calcium chloride was added, while the phenol oxidase-like (PO) activity was assessed by omitting SDS adding only PBS. Absorbance was measured at 492 nm for 15 minutes. One arbitrary unit (U) of proPO or PO represents the raise of 0.001 of absorbance /min /mg of protein.

Leucine Aminopeptidase

This method was based on Travers et al. (2008). Reaction was started by adding the substrate, 2.3 mM Leucine-p-nitroanilide (Sigma L9125 in 10 mM of Tris: methanol 2: 1) before measuring absorbance at 405 nm for 30 minutes. Leucine aminopeptidase (Sigma L9125) was used as standard and its activity was expressed in milliUnits (arbitrary Unit) /mg proteins.

Statistical analysis

All analyses were done on raw data using One Way Analysis of Variance (ANOVA) to determine the difference in the mean values of dependant parameters when normality (Kruskall-Wallis) and homogeneity of variance (Bartlett and Levene tests) were respected. A nonparametric test was performed when normality was not obtained (Wilcoxon). Then, for the GSI, viability, cell count, phagocytosis as well as humoral and antioxidants data, each result was compared between each sampling period (October 2010, February 2010 and May 2011). For the antioxidants, results were also compared between hemocyte lysates and hemolymph. However, for ROS and NOx production, data were Arcsin of the square root transformed before performing a two way ANOVA, to determine the effect of treatments (stimulants and control), period and their interaction. A One way analysis of variance was also performed for the unstimulated data to compare them between months whenever possible. Post hoc analyses were done by a Multiple Pairwise Comparison Procedure to isolate the groups significantly different ($P < 0.05$) from each other (Tukey-Kramer). All statistics were done using JMP 9.0 statistical discovery software.

1.3. Results

Gonado Somatic Index

The gonado somatic index of mussels increased significantly from 0.22 ± 0.05 in October 2010 to 0.43 ± 0.07 in May 2011 (Fig. 3). The index value from February could not be compared to its value from May due to a large difference among variance). However, October and February results are not significantly different from each other because the difference in variance can only raise the possibility to obtain a type 2 error (Underwood, 1997).

Cell count and viability of hemocytes

Viability was near 95% for all pools of hemocytes collected from October 2010 to May 2011 and the lowest value was 88% for a pool collected in May. The mean cell count was $800\,000 \pm 200\,000$ in October, $470\,000 \pm 280\,000$ in February and $450\,000 \pm 110\,000$ in May (mean \pm S.D., N=5). Cell count was significantly different only between October and May ($P < 0.05$).

Cellular Immunity

The mean phagocytic index of mussels was determined in October, February and May (Fig.4). Even though there is no major difference between sampling periods, the lowest index ($37\% \pm 12$) was reported in October 2010 and the highest ($52\% \pm 14$) in May 2011.

The production of reactive oxygen species (ROS) of hemocytes from October 2010 to May 2011 was expressed in arbitrary units of fluorescence to show the values of unstimulated hemocytes (Table 1). Their values determined in February and May are significantly different from each other ($P < 0.0001$). The ROS production expressed in percentage of control (Fig. 5), clearly shows that the greatest raise in ROS production

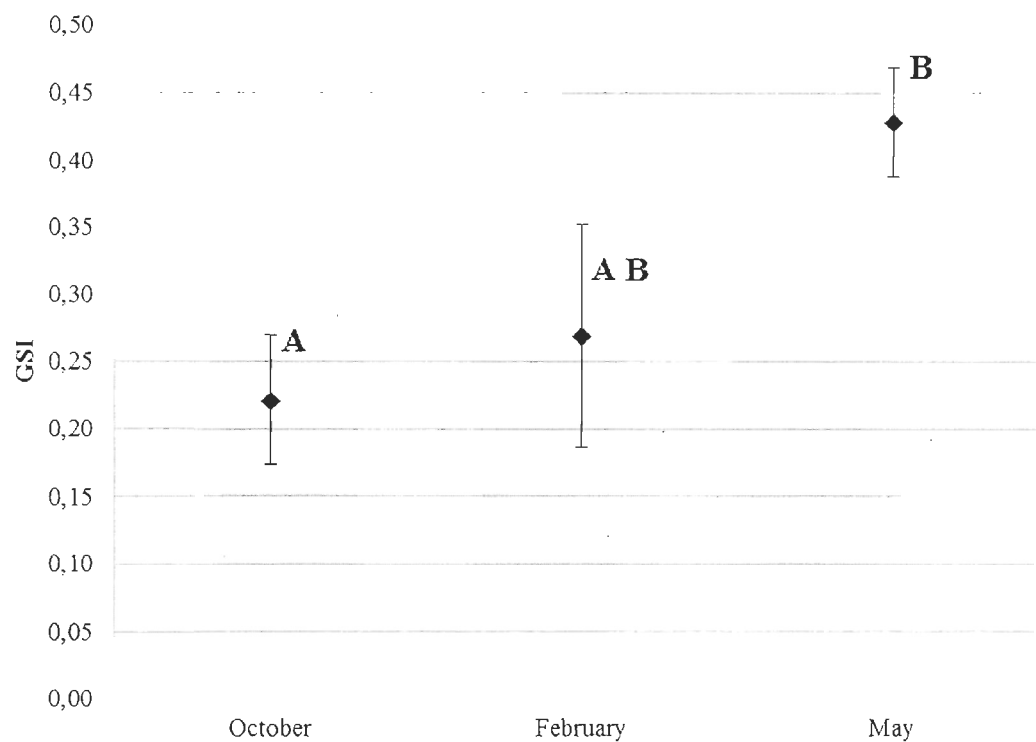


Figure 3. Gonado Somatic Index (GSI) from October 2010 to May 2011. Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$) between data; values are mean \pm S.D., $N = 15$).

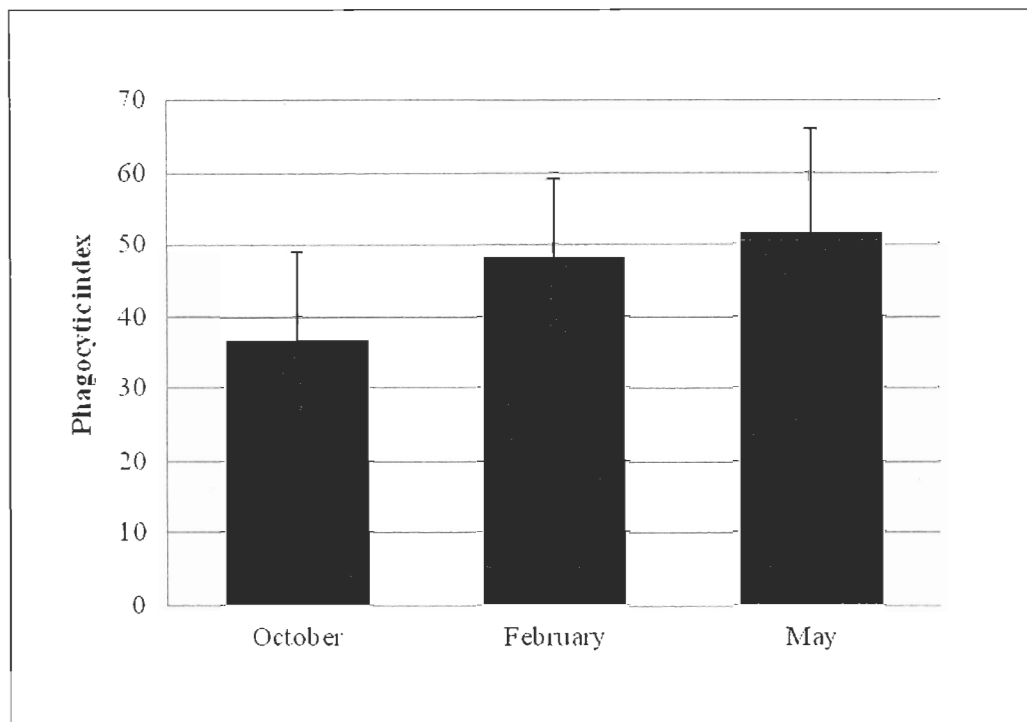


Figure 4. Phagocytic index (%) from October 2010 to May 2011
(values are mean \pm S.D., N = 5).

Table 1 : ROS production in hemocytes (in arbitrary units of fluorescence) after stimulation with LPS, Beta Glucans or Zymosan (values are mean \pm S.D., N = 5).

<i>Treatment</i>	<i>October*</i>	<i>February</i>	<i>May</i>
<i>Control</i>	90 \pm 20	1118 \pm 86 ^a	382 \pm 218 ^b
<i>LPS</i>	117 \pm 23	821 \pm 439	806 \pm 158
<i>Beta-glucans</i>	113 \pm 26	668 \pm 312	598 \pm 168
<i>Zymosan</i>	129 \pm 27	816 \pm 163	921 \pm 129

* October results cannot be compared to February and May because a different probe was used for their detection.

a, b Results significantly different in the same row (P<0.0001).

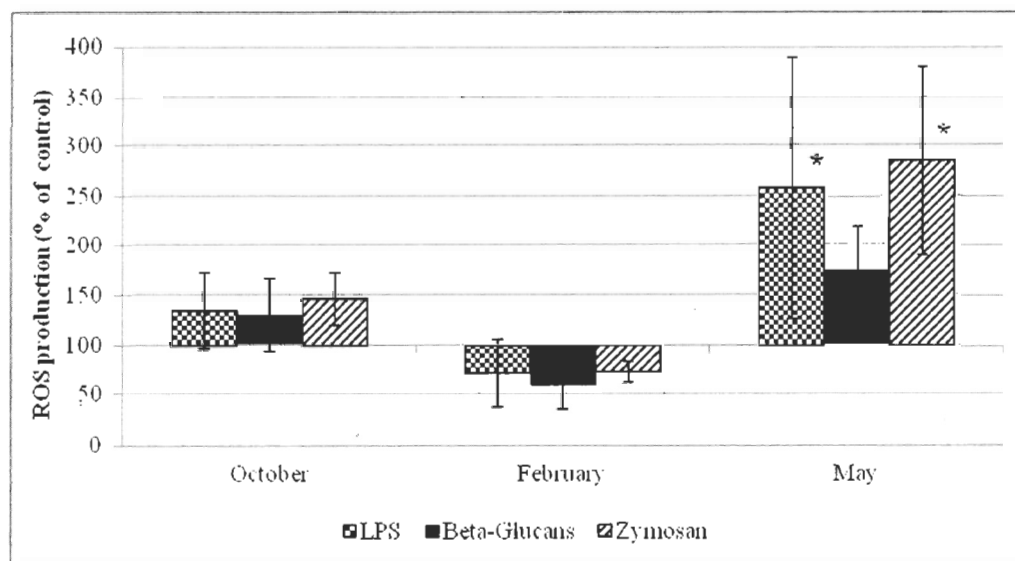


Figure 5. ROS production in hemocytes stimulated with LPS, Beta Glucans or Zymosan expressed in percentage of control (without stimulation).

Labelling with * indicates a significant difference (P<0.05) with respect to control (values are mean \pm S.D., N = 5).

occurred in May, with a 74%, 157% and a 184% raise after the treatment with beta glucans, LPS and zymosan, respectively. In May, ROS production treated with zymosan was significantly higher than control ($P<0.001$) and higher than ROS production in mussels treated with beta glucans ($P<0.05$). Treatment with LPS is also significantly higher than control ($P<0.05$). Variance was greater for data after LPS treatment and the lowest for data after beta glucans treatment when compared to control. In February, all treatments resulted in lower mean ROS production of hemocytes in comparison to the control. This difference from control was significant after the treatment with beta glucans ($P<0.05$). In Table 1 there is also a great difference in variance between data collected in February for the control group and stimulated hemocytes. In fact, all 5 pools had their mean fluorescence within 86 A.U. before the treatment, but after treatment, mean fluorescence varies from 163 to up to 439 A.U.. Such variability is not observed in October, and it is even the opposite pattern that occurs in May since data for the control are very dispersed. However, all data were much more comparable after the treatment whatever the potential stimulant. Table 2 gives the results of the two-way ANOVA analysis of the effects of the sampling period, the treatment and their interaction on the ROS production. The sampling period and its interaction with the treatment had significant effect on the ROS production by hemocytes ($P<0.05$).

The production of nitrogen oxide (NOx) of hemocytes are presented in arbitrary unit of fluorescence (A.U.) (Table 3) and expressed in percentage from control (Fig.6). The control values were gradually lower from October to May. Values determined in October and February were significantly different from data in May ($P<0.05$) although they were not different from each other. The NOx production in hemocytes treated with the beta glucans was lower than control for all sampling periods (73%, 67% and 86% of control in October, February and May respectively) but these results are not statistically significant. After LPS and zymosan treatment, ROS production was also lower in comparison to the control in October (87% each) but higher in February (124% for LPS and 115% for zymosan) and May (113% for LPS and 122% for zymosan). These changes are not

Table 2 : Two-way ANOVA analysis of the effect of treatment, sampling period and their interaction (x) on the ROS production in hemocytes after stimulation with LPS, Beta Glucans or Zymosan.

	<i>DF</i>	<i>Mean square</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>Treatment</i>	3	0.5196	1.8289	0.1548
<i>Period</i>	2	2.4246	85.3435	< 0.0001*
<i>Treatment x Period</i>	6	0.1355	4.7698	0.0007*
<i>Error</i>	47	0.0028		

* Results significantly different

Table 3 : NOx production in hemocytes (in arbitrary units of fluorescence) after stimulation with LPS, Beta Glucans or Zymosan (values are mean \pm S.D., N = 5).

<i>Treatment</i>	<i>October</i>	<i>February</i>	<i>May</i>
<i>Control</i>	378 \pm 35	291 \pm 115	155 \pm 76
<i>LPS</i>	318 \pm 59	360 \pm 156	165 \pm 66
<i>Beta-Glucans</i>	268 \pm 53	174 \pm 118	137 \pm 86
<i>Zymosan</i>	325 \pm 112	337 \pm 139	178 \pm 51

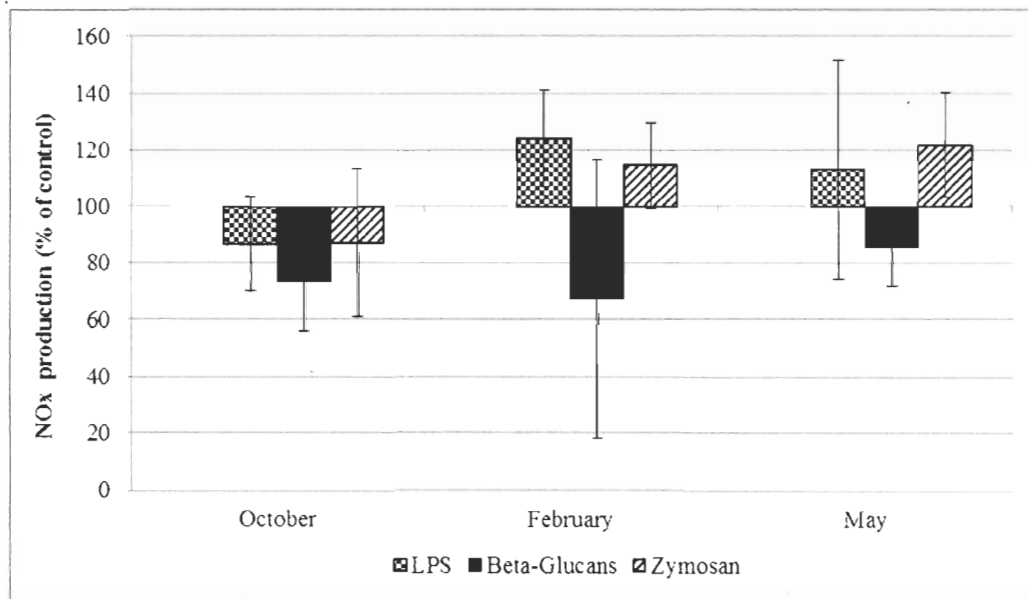


Figure 6. NOx production in hemocytes stimulated with LPS, Beta Glucans or Zymosan expressed in percentage of control (values are mean \pm S.D., N=5).

statistically different from control, in part because of the difference in variance between data for each treatment (Table 3). In October, it is possible to notice a great rise in variation of data after the zymosan stimulation (325 ± 112 A.U.) in comparison to the variance of data for the control (387 ± 35 A.U.). In February and May, NO_x production from treated samples is comparable to the control. However, when the results are expressed in percentage to the control in figure 6, mean NO_x production is lower in pools stimulated with Beta glucans whatever the period and lower than in control whatever the treatment in October. In February, data collected after a stimulation with the beta glucans immediately stands out as being different and highly variable (variation increased more than threefold) in comparison to data from pools stimulated with LPS and Zymosan as well as data collected in October 2010 and May 2011. The higher variability of data can also be observed in May after stimulation with LPS increased variation twofold. Variance is therefore an interesting parameter for the analysis of this set of data even though it renders statistical comparison difficult. The two-way ANOVA analysis of the effect of the sampling period, the treatment and their interaction on NO_x production of hemocytes demonstrated (Table 4) that the treatment ($P < 0.05$) and the sampling period ($P < 0.001$) has significant effects on data.

Antioxidants

Figure 7 presents the activity of antioxidant enzymes determined in the hemolymph and hemocyte lysates. Protein concentrations in pools used for these analyses were 1.78, 1.81 and 1.96 mg/mL in hemolymph and 1.32, 1.40, 1.25 mg/mL in the hemocytes lysates, respectively in October, February and May. All over the sampling period (all data taken together) the difference between concentration of proteins in hemolymph and hemocytes is significant ($P < 0.05$). Catalase activity (CAT) was not detected in hemolymph. The highest CAT in hemocytes lysates was 27 ± 8 μ moles/mg proteins in May, but close to 12 ± 6 μ moles/mg protein in October and as low as 6 ± 0.02 μ moles/mg protein in February. Whatever the sampling period, the superoxide dismutase activity (SOD) was around 40

Table 4 : Two-way ANOVA analysis for the effect of treatment, period and their interaction (x) on the production of NOx in hemocytes after stimulation with LPS, Beta Glucans or Zymosan.

	<i>DF</i>	<i>Mean square</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>Treatment</i>	3	0.0306	3.3996	0.0251*
<i>Period</i>	2	0.1536	17.0343	<0.0001*
<i>Treatment x Period</i>	6	0.0549	1.0156	0.4265
<i>Error</i>	48	0.0090		

* Results significantly different

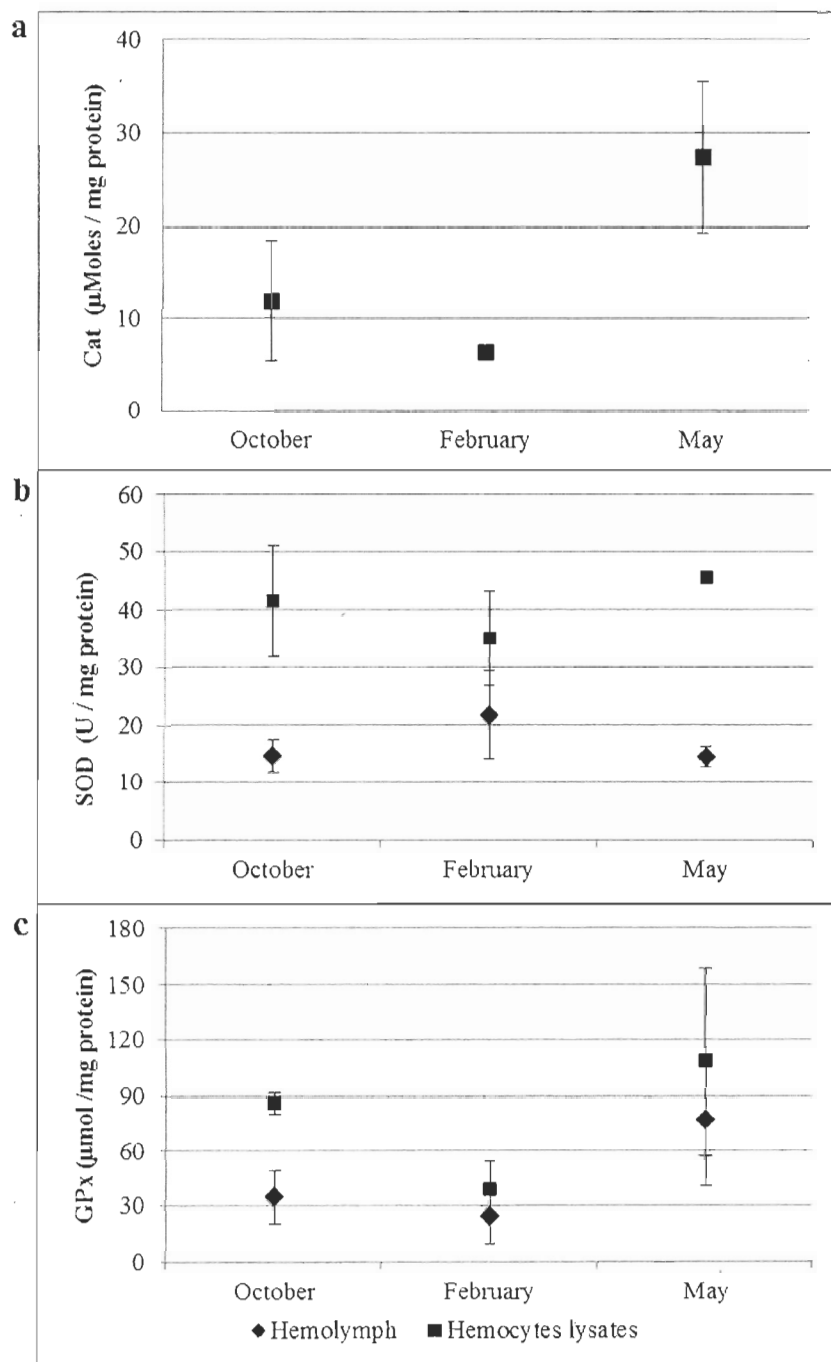


Figure 7. a Catalase (CAT), b superoxide dismutase (SOD), and c glutathione peroxidase (GPx) activity in the hemolymph and hemocytes lysates from October 2010 to May 2011 (values are mean \pm S.D., N=2).

U/mg protein in the hemocytes lysates while the activity was approximately twice lower than in hemolymph (see figure 7). This difference of activity between the hemolymph and the hemocyte lysates was significant ($P < 0.05$). In February, SOD had the lowest activity of the sampling period in the hemocytes lysates but the highest activity in the hemolymph. The highest SOD in the hemocytes lysates (45.59 ± 0.12 U /mg protein) was reported May. Highest glutathione peroxidase activity (GPx) was reported in May. Mean values (expressed in $\mu\text{mol/mg protein}$) were 86 ± 6 in October, 39 ± 15 in February and 107 ± 51 in May in the hemocytes lysates, and 34 ± 14 in October, 24 ± 15 in February and 76 ± 35 in May in the plasma. For all antioxidants enzymatic activities, variance was very different between data from each month which rendered statistical comparisons very difficult. Analysis of ranks like Kruskal-Wallis tests are not recommended because of the small sample size and transformation of data for linear models did not give any explanation to the variation observed between samples.

Humoral immunity:

Mean protein concentrations in hemolymph were 2.03, 1.41 and 1.90 mg /mL respectively in October, February and May. Activity of acid phosphatase (AP), Leucine aminopeptidase (LAP) and the proPhenoloxidase (proPO) in hemolymph are presented in figure 8. AP was significantly higher ($P < 0.05$) in May with almost 90 nmol nitrophenol/mg protein in comparison to AP determined in October and February (both approaching 50 nmol/mg protein). PO activity was not detected in samples (not shown) while the prophenoloxidase-like (proPO) activity was easily quantified since the absorbance of the samples stimulated with SDS (to detect proPO) was 100 fold higher than absorbance of the same samples without SDS (to detect PO). The proPO was significantly different ($P < 0.05$) between the highest mean determined in February (4.8 mU/mg protein) and the lowest mean reported in October (3.5 mU/mg protein). LAP increased significantly from October to May (respectively 63, 86 and 116 mU/mg protein). There was almost twice as much LAP measured in May than there was in October, which is significantly different ($P < 0.05$) although data from February are not different from data in May or in October.

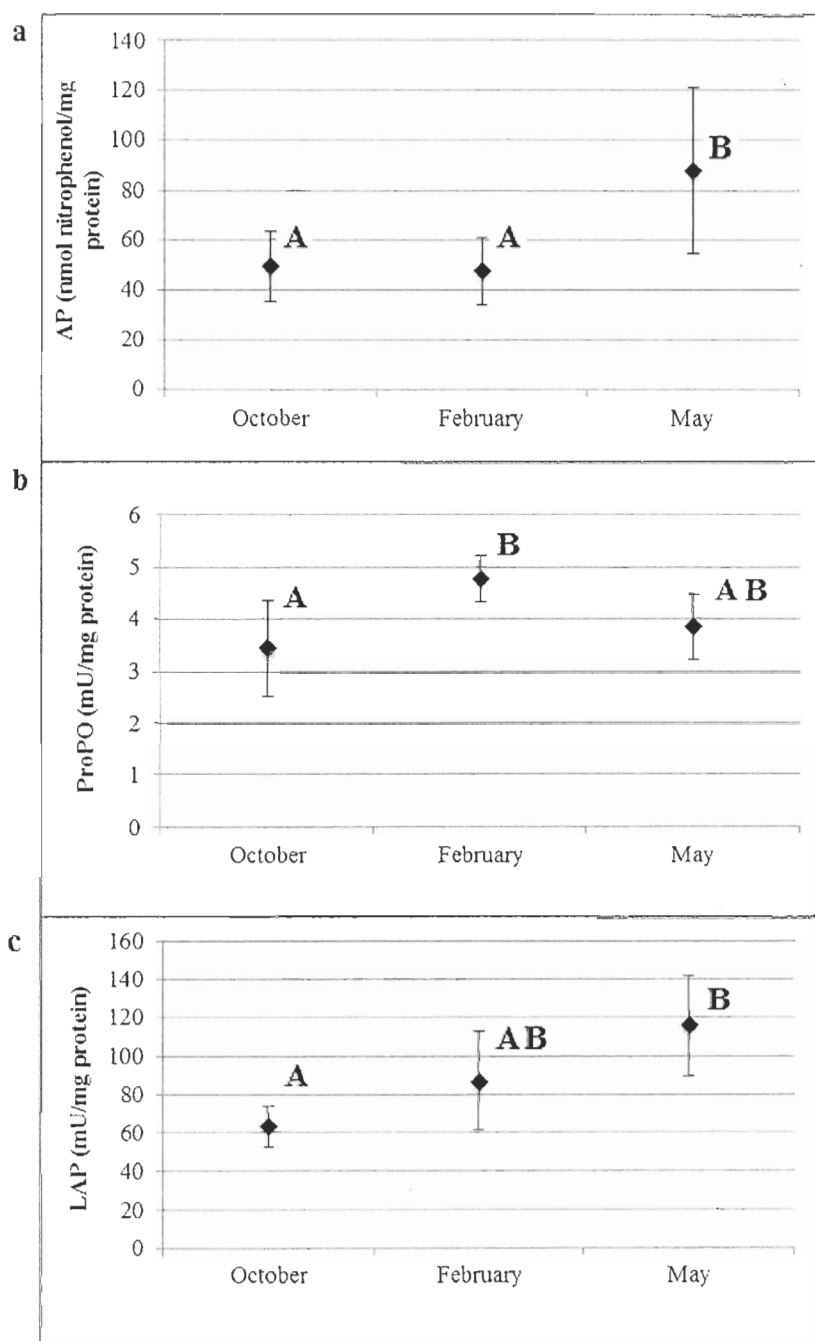


Figure 8. **a** Acid phosphatase (AP), **b** proPhenoloxidase (proPO) and **c** leucine amino peptidase (LAP) activity in the hemolymph from October 2010 to May 2011. Different letters (A, B) indicate a significant difference ($P < 0.05$) between data (values are mean \pm S.D., $N=5$).

1.4. Discussion

Farming of *Mytilus edulis* in the province of Québec (eastern Canada) is a growing industry which currently involves a dozen farmers. Mortalities were first reported in 1975 and were still occurring regularly until a more resistant population was introduced (Myrand et al., 2000). Assessment of the immunity of these mussels could provide important observations regarding how they can face environmental stress and help determine what could triggers mortalities in other populations.

The reproductive cycle is one of the most important aspects that explains the seasonal variation of immunity (Santarem et al., 1994). In Eastern Canada, the blue mussel is spawning usually in June until end of July. Our data show that mussels in October had the lowest GSI, therefore demonstrating that they were free of gametes and had not yet started gametogenesis. Mussels sampled in February, however, had an intermediate GSI and the greatest variation in GSI between individuals within the sample. This suggests that at this moment gametogenesis was actively taking place within the mussel population. If developing gametes took up most of the energy in February, it is assumed that the energy available to the immune system was minimal at this period (Myrand et al., 2000). The mussels sampled in May had the highest GSI, indicating that the mussels were sexually mature and getting ready for spawning in June.

A high hemocyte concentration in October could be associated with a complete recovery after 3 months following the end of spawning. During this period, chlorophyll concentration is high in Baie-de-Plaisance (Madeleine Nadeau, pers. comm) and this high food supply may have benefitted the mussels, allowing them to gain higher energy levels before the winter. Hemocyte count in May was 56% of what was measured in October, although most cells were viable in all three periods. It seems that as the energy balance is shifted toward the mantle during gametogenesis (Delaporte et al., 2006), the hemocyte count in the hemolymph gradually gets lower. It may be the result of the migration of the hemocytes to the gamete to support gametogenesis (Cochennec-Laureau et al., 2003).

However, this lower hemocyte counts also suggests a potential diminution in immunocompetence as mussel health highly depends on the number of effective immune cells that can detect and destroy foreign material (Auffret et al., 2006).

Since phagocytosis is the most efficient way of getting rid of foreign particles, a stable phagocytic index is very important to maintain immune capacity. In this study, hemocytes were slightly more efficient in the spring than in the fall (54 % and 37%). However, some authors reported that the phagocytic capacity in *Mytilus edulis* and other species like *Crassostrea gigas* was lower during spawning and reached a maximum in autumn (Lemaire et al., 2006; Duchemin et al., 2007). However, if we consider the THC taken in October and in May, more cells were capable of phagocytosis in October (estimated to be 296 000 cells per mL) than in May (estimated to be around 234 000 cells per mL), although these numbers are very close together. This means that the phagocytic capacity of the immune system is approximately the same in all samples. Granulocytes are thought to be the main cell type responsible for phagocytosis (Goedken et al., 2004). Differences in phagocytic index measured could therefore be due to the proportion of each cell types. Ford et al. (1993) have previously observed that the migration of cells in the tissues of infected oysters occurs differently for the two cell types. Granulocyte migration in tissues have been confirmed to occur within gill mantle and connective tissue (Xue and Renault, 2001). Our study did not separate the hyalinocytes and the granulocytes, but according to the phagocytic index, there could be slightly more circulating granulocytes in May.

The reactive oxygen species production per hemocytes is required to eliminate phagocytised particles and our results show that the oxidative burst following similar stimulation was extremely variable from October to February. Other authors have also encountered these observations and for most of the research done with bivalves the greatest challenge is to deal with the important inter-individual variation, especially for the oxidative burst (Buggé et al., 2007). Nevertheless, the stimulation of the ROS production better reflects the efficiency of the oxidative burst in presence of phagocytised particles,

which is why we realised *in vitro* stimulations of sampled hemocytes with zymosan, LPS, beta glucans to mimic the presence of bacteria. In October, all stimulants raised ROS production, even if the rise was not considered different from the control value. This seems to indicate an adequately working ROS system which could be able to respond adequately to an infection. On the contrary, adding zymosan, LPS or beta glucans in February hindered ROS production compared to the control group. How is this possible? One way of assessing those results is that the production of ROS can be reduced by the high production of antioxidants, which is used to prevent damage to the organelles by the oxidative burst (Buggé et al., 2007). It is also possible that the hemocytes had already been stimulated by the stress of physical manipulation alone and that adding a stimulant only triggered down regulation of this system (Delaporte et al., 2003). In May, however, the control signal is much lower than in February and stimulation raised the ROS production to at least 150% for beta-glucans from up to almost 300% for zymosan. This indicates that in May, the mussels were potentially more able of killing pathogens than in February.

On the other hand, the use of Beta-glucans did not trigger stimulation but rather inhibited NO_x production. This suggests that the inductive pathways for the ROS and the NO_x production are different. Beta-glucans have been previously capable of stimulating NO_x in the mussel *Mytilus galloprovincialis* after a similar 1 mg/ml 2 hours incubation *in vitro* (Costa et al., 2008). This would require further testing as it could be a difference between these two species. However, in all sampling periods the effect of LPS and zymosan on the ROS and NO_x were comparable. This may imply that the presence of Gram-negative bacteria and yeast is triggering similar cellular mechanisms leading the same type of control of ROS and NO_x production. As for the relatively strong control stimulation, there is a possibility that, like in vertebrates, an inducible and a constitutive form of NO_x production exist (Conte and Ottavini, 1995). The calmodulin dependant nitric oxide synthase would be induced by the detection of foreign particles while the calmodulin independant form of the synthase would be constitutively expressed like in vertebrates. These two forms of expression could also be influenced by seasonal variation. Another interesting observation upon results is that for LPS and zymosan in October and February,

the effects of ROS and NOx are opposed. The results in May are the only ones showing stimulation in both cases. There is a possibility that production of NOx and ROS are down regulating the production of one another because of the high potential toxicity of peroxynitrite (Beckman et al., 1990). The NOx production is already thought to be involved in the down regulation of cellular immunity by the activity of the Nitric Oxide (Cao et al., 2007). If this is correct then there is possibly a seasonal variation between which of ROS or NOx is triggered upon the same stimulants. This also implies that following gametogenesis, the double stimulation of ROS and NOx observed could be damaging to the cells, which could lower immunocompetency. Seasonal variations have been observed both for ROS and NOx production, but to our knowledge, studies involving invertebrates are not yet following both productions at the same time. Our results show that there might be a very important relation between those parameters. Following yearly variation of this phenomenon would be very relevant for further study.

When analysing the cellular component of immunity in this study, it is possible to consider that phagocytosis should not be the only criteria that defines the cellular immunocompetency, as our samples had a very similar phagocytic capacity whereas the stimulation of the oxidative burst is very variable both in individual cells between samples from the same period and in terms of sampling period. In May, mussels are indeed generating both ROS and NOx which according to some authors could be damaging to the hemocytes and hinder the efficiency of the immune system.

Then, upon analysing the antioxidant enzymes activity, the first observation was that catalase was only detected in the hemocytes, probably because it is almost exclusive to peroxisomes (Livingstone et al., 1992). The increase in CAT activity in hemolymph from mussels sampled in May could also reflect a protecting role of CAT against stressful temperatures affecting hemocytes' integrity. Dellali et al. (2001) reported a rise in catalase activity in the tissues of mussels and clams during summer and defined water temperature as a significant correlating factor to the variation they observed. SOD was previously detected in the hemolymph of *Mytilus edulis* by Pipe (1992) and can raise the cell capacity

to resist oxidative damages. We have perceived twice as much activity in hemocytes lysates than in the hemolymph and the sum of SOD both activities in hemocyte lysate and in hemolymph in each period are comparable. In February, when the activity of SOD was more important in hemolymph it was less active within cells, which may simply reflect a higher cellular release of SOD during this period. Cytoplasmic SOD is indeed released into the extracellular compartment by a N-terminal signal cleavage route that leads to secretion and the secreted SOD appears to be capable of LPS binding, which implies an agglutination capacity for Gram negative bacteria (Gonzalez et al., 2005). The GPx in *Mytilus edulis* is selenium dependant, which is very similar to the human Se-dependant GPx (Coles and Pipe, 1994). Most research detected its presence in the digestive glands and in various tissues sample (Ribera et al., 1989; Biswaranjan and Chainy, 2010). However, it is apparent by our results that it is present in the hemolymph and hemocytes lysates of *Mytilus edulis*. Knowing that, a close monitoring of antioxidants in the hemocytes would be of importance, since the perturbation of their efficiency would increase hemocyte damage by the oxidative stress and then potentially generate mussel mortality upon bacterial infection (Cheng et al., 2004; Banakou and Dailianis, 2010; Yue et al., 2011). Consequently, the direct impact of antioxidants level upon ROS and NOx neutralization should imply co-studying both aspects regarding a potential weakening of the immune system capacity.

The humoral immunity might also be subject to a seasonal impact. Protein content in hemolymph generally declines before spawning (Li et al., 2009). The highest protein content in hemolymph occurred in October and the lowest occurred in February, when gametes are thought to have been actively developing as mentioned above. Regarding all humoral parameters, values were lower in October and higher in May, except for the ProPO which was highest in February. AP results were at least 1.8 times higher in May than in February or October. The seasonal activity of AP measured by Genthner et al. (1999) in oyster *Crassostrea virginica* did not show any variation. Nevertheless, there has been seasonal differences observed in *Mya arenaria* regarding percentage of cells actively showing AP in their intracellular content (Huffman and Tripp, 1982). It is therefore possible that there are important interspecific variations of this factor. ProPO was

significantly higher in February than in October. Its activity has previously been reported to rise upon low or medium parasitism, is also efficient against bacterial infection and can even be released upon physical injury (Hong et al., 2006; Munoz et al., 2006). Such relationship between the proPO and bacterial susceptibility was also reported in the mollusc *Haliotis tuberculata* (Travers et al., 2008). Results show a monthly fluctuation in concentrations which would need to be further investigated as it could be the result of release from the hemocytes. The Leucine aminopeptidase detected in our samples increased from October to May. In *Haliotis tuberculata*, Travers et al. (2008) observed an increasing activity of aminopeptidase during gamete development. Even though our study occurred on a different timeline, results appear to be consistent with these observations.

As a conclusion, several components of immunity were examined during key phases of the reproductive cycle of the blue mussel *Mytilus edulis* (energy storage, early and final phase of gamete development) and our research demonstrates important variation in both cellular and humoral immunocompetency. Gametogenesis mainly occurred in February. The cell counts diminished significantly from October to May but the phagocytic index increased so the number of efficient cells remained the same. ROS production was much lower in May for unstimulated samples compared to February, but its capacity to be stimulated upon LPS or zymosan was improved significantly. NOx stimulation was observed in February and May but not in October. This shows that research should definitely focus more on the immune system as a whole, rather than studying individual components because some of its parameters, primarily phagocytosis, oxidative burst and the production of antioxidants, are impacting on one another. The cellular immunity is probably its most important feature and, even if phagocytic capacity has not shown any variation, values of production of ROS and NOx following stimulation have been fluctuating. The study of their seasonal variation clearly needs to be further investigated. Separation of the Antioxydants activity in hemolymph and hemocyte lysates allowed a relevant understanding of the secretion of SOD. Humoral immunity can also provide information via the production of enzymes including prophenoloxidase, acid phosphatase and aminopeptidase. Our study did not find a significant difference in the activity of these

enzymes, which could have been a sign of infection, but they still need to be considered in future studies. The activity of ProPo has however, been demonstrated in the hemolymph of *Mytilus edulis*. It might be relevant to also measure the accumulation of humoral enzymes in the hemocytes in the future, as it could provide a better understanding in the fluctuations observed in some enzymes. Prospective research also implies the verification of antioxidants production in conjunction with ROS and NOx stimulation studies in the hemocytes, as their stimulation without neutralization by antioxidants can induce important cellular toxicity. Weakening of the immune system could mean an open door to opportunistic invasion of the organism, which often results for the blue mussel in mass mortalities. Preventing these mortalities starts with knowing when vulnerabilities occur within the reproductive cycle and what triggers the diminution in immunocompetency.

CHAPITRE 2 :

PHENOTYPAGE DES HEMOCYTES DE LA MOULE BLEUE, *MYTILUS EDULIS*, PAR L'UTILISATION DE LECTINES

2.0. Résumé

La méthode de marquage par les lectines a été mise au point et utilisée comme technique de phénotypage des hémocytes de la moule bleue, *Mytilus edulis*, à deux périodes différentes de la gamétogénèse afin d'observer des variations dans les proportions des deux types cellulaires. Les lectines « soybean agglutinin » (SBA, isolée du soya), « peanut agglutinin » (PNA, isolée de l'arachide) et « wheat germ agglutinin » (WGA, isolée du blé) ont été utilisées en cytométrie en flux. L'inhibition du marquage a été testée par l'utilisation de sucres spécifiques aux glycoprotéines. Les liaisons sur les hémocytes ont été observées par microscopie confocale. Les marquages aux SBA et au PNA marquent préférentiellement les granulocytes tandis que le marquage à la WGA marque les deux types hémocytaires. La population de granulocytes présente un marquage réduit pour certaines cellules, suggérant la présence d'une population intermédiaire de granulocytes, alors qu'une simple analyse au cytomètre ne permet pas toujours cette observation. Le marquage des hémocytes en février et en mai a montré des différences quant aux proportions de types cellulaires, avec une diminution des granulocytes en circulation de 7 % entre les deux périodes. Cette étude montre qu'un phénotypage par les lectines est envisageable pour des études ultérieures et facilite la différenciation des types cellulaires. Il est de plus possible de suivre les proportions de chaque type cellulaire par une étude temporelle grâce à la méthode proposée.

Mots clés : *Mytilus edulis*, moule bleue, saisonnier, aquaculture, phénotypage, lectines, SBA, PNA, WGA, types cellulaires.

Contexte du projet

Ce second article fut rédigé par moi-même. Le Dr Sophie Gauthier-Clerc a également participé à sa révision. La méthode utilisée a été transmise par le Dr Michel Auffret, qui a également fourni une partie du matériel utilisé et a participé à ma formation. En tant que premier auteur, ma contribution à ce travail fut l'essentiel de la recherche, de la mise au point de la méthode, l'exécution des analyses et la rédaction de l'article.

Phenotypage des hémocytes de la moule bleue, *Mytilus edulis*, par l'utilisation de lectines

2.1. Introduction

L'immunité cellulaire chez les bivalves est étudiée depuis déjà plusieurs décennies. La présence dans l'hémolymphe de plusieurs types cellulaires est rapportée : des cellules granulaires, les granulocytes, et des cellules agranulaires, les hyalinocytes, sont décrites par la plupart des auteurs, bien que ces catégories sont parfois divisées elles-mêmes en sous-groupes (Cheng et al., 1980 ; Feng, 1988). Les recherches sur la classification des hémocytes ont amené à proposer différents types de classification, de par la nature de leurs organelles, leur affinité à certains types de colorants (immunohistochimie) ou leur morphologie par microscopie (Auffret, 1988). Néanmoins, toutes ces méthodes ne permettent pas d'effectuer rapidement des analyses en grand nombre. De plus, elles ne tiennent pas nécessairement compte des fonctions immunologiques des hémocytes, qui seraient différentes, et la phylogénie de ces cellules demeure encore incertaine (Parisi et al., 2008).

Grâce à la cytométrie en flux, des avancées ont été faites quant aux différences de propriété des grands types cellulaires (Goedken et de Guise, 2004;Gauthier-Clerc et al. 2009). Il est possible, grâce à cette technique, de compter rapidement et efficacement de nombreuses cellules individuelles et d'étudier leurs propriétés de taille (« Forward Scatter height » FSC-H), de complexité (« Side Scatter height » SSC-H) ainsi que la présence potentielle de particules fluorescentes (Marrone, 2009). L'utilisation de sondes de type DAF-FM, DCFDA ou encore de molécules marquées par des fluorochromes permettent par exemple de quantifier des réactions physiologiques comme la flambée oxydative, la phagocytose ou de détecter la présence de récepteurs membranaires. Un phénotypage des cellules, soit une identification par le marquage en surface de récepteurs membranaires

spécifiques à un type cellulaire ou de caractéristiques de structures (sites de liaison), permettrait de faciliter leur différenciation, offrirait une piste de classification fonctionnelle et permettrait d'en savoir plus sur leur phylogénie. Les études sur l'immunocompétence des bivalves pourraient ainsi bénéficier d'une méthode simple et rapide de dénombrer les différentes populations cellulaires, par exemple pour étudier des variations de proportions de chaque type cellulaire selon la période de l'année.

Les lectines sont des protéines qui se lient à des sucres spécifiques par une liaison non covalente (Gauthier et al., 2004). Les membranes cellulaires possèdent de nombreux types de glycoprotéines se liant normalement à des sucres distinctifs et certaines lectines peuvent remplacer cette liaison, ce qui constitue une méthode simple de confirmer la présence de ces protéines membranaires (Gupta et al., 1991 ; Mullainadhan et Ranwranz, 1985). Ce système pourrait potentiellement participer entre autres à la reconnaissance du non-soi, car l'activation de ces sites de liaisons sur les hémocytes active le système immunitaire (Dam et Brewer, 2010 ; Adema et al., 1991). Certains auteurs ont déjà rapporté chez *Mytilus edulis* des différences quant aux types cellulaires capables de lier différentes lectines (Pipe et al., 1993). La présence de récepteurs distincts sur la surface des types cellulaires serait représentative de leurs rôles différents dans l'immunocompétence (Carballal et al., 1997a).

L'objectif principal de cette étude est de valider la faisabilité d'un phénotypage des hémocytes de la moule bleue, *Mytilus edulis*, par un marquage des sites de liaison en utilisant des lectines marqués par un fluorochrome et une analyse par cytométrie en flux. Nous avons ensuite testé ce phénotypage sur des périodes différentes du cycle reproducteur de la moule afin de vérifier la variation éventuelle des populations cellulaires.

Les lectines utilisées ont été déterminées par leur disponibilité ainsi que par celle de leur inhibiteur afin de pouvoir confirmer la spécificité du site de liaison au récepteur. « soybean agglutinin » (SBA) est une lectine isolée du soja tandis que « weat germ

agglutinin » (WGA) provient du blé et « peanut agglutinin » (PNA) est extraite de l'arachide. Ces trois lectines sont les plus susceptibles de présenter un marquage différentiel sur les populations d'hémocytes (Pipe, 1990a). Le marquage sera également observé à l'aide de la microscopie confocale afin de vérifier visuellement la localisation des lectines liées aux hémocytes. Pour s'assurer que les lectines étaient effectivement liées aux sites de liaison membranaires des hémocytes qui leur sont spécifiques, une inhibition compétitive a été effectuée. Cette inhibition se produit lorsque les sites spécifiques sont exposés à leur ligand naturel, qui entre en compétition avec les lectines qui ne peuvent alors plus se lier de manière non covalente au site. De plus, afin d'avoir une observation visuelle du marquage et de confirmer sur quel type d'hémocyte les lectines sont fixées ainsi que leur localisation sur les cellules, un examen des hémocytes en microscopie confocale et en épifluorescence a été effectué. L'utilisation du microscope confocal permet non seulement une meilleure résolution que la microscopie conventionnelle, mais utilise une analyse optique qui permet d'observer les cellules en 3 dimensions et d'en observer chaque « tranche optique » sans les endommager. Ceci permet de confirmer la provenance d'un signal fluorescent, qu'il soit en surface ou dans un compartiment interne.

2.2. Matériel et méthodes

Des moules élevées en suspension (taille moyenne 63 mm, N=80) ont été collectées sur un site situé dans la baie de Plaisance aux îles de la Madeleine (47° 22' -1" 6.30"N, 61° 44' -1" 56.22" W) à environ 5 kilomètres de la côte et éloigné de toute source anthropique de contamination par le rejet d'eaux usées ou des activités portuaires. Les moules ont été maintenues dans deux aquariums à l'Institut des Sciences de la mer de Rimouski dans de l'eau salée oxygénée (28 ppm ; 80 % d'oxygène; désinfectée aux UV) afin de diminuer le stress lié à leur transport incluant l'exposition prolongée à l'air puisque ces facteurs peuvent influencer la réponse immunitaire des bivalves (Malagoli et al., 2007). La température de l'eau a été ajustée pour qu'elle soit similaire à celle de la zone d'échantillonnage (3 °C en février et 5 °C en mai). Il n'y a pas eu de manipulations des moules moins de 24 heures avant les ponctions pour assurer des conditions de stress minimales. Suivant cette période de repos, les moules ont été ponctionnées dans le muscle adducteur postérieur avec des seringues de 3 ml et des aiguilles de taille 23G. Les ponctions ont été faites avec délicatesse afin d'éviter les dommages aux tissus et aux cellules et ont par la suite été passées à travers un filtre en nylon à mailles de 80 microns. Cinq pools ont été préparés en utilisant l'hémolymphe de 5 moules ou plus pour obtenir un volume final par pool de plus de 5,5 ml.

Marquage des hémocytes avec les lectines

Le marquage avec les différentes lectines a été réalisé selon la méthode du Dr Michel Auffret (communication personnelle). Les hémocytes ont d'abord été fixés durant 15 minutes au Cellfix (Becton et Dickinson) à une concentration de 1 :10 dans l'hémolymphe avant d'y ajouter 500 µL de tampon HEPES (0.1M HEPES (Sigma H7006), 0.012M NaN₃ (Sigma S8032) et 0.15M NaCl, pH 7.4) réfrigéré. Deux centrifugations légères (300 g ; 10 minutes) ont permis de laver les hémocytes en les resuspendant d'abord dans le tampon HEPES après la première centrifugation puis dans un tampon "Lectine" composé du tampon HEPES mentionné plus haut additionné de MgCl₂ (concentration finale 0.004M) et

de CaCl_2 (concentration finale 0.005M). Les hémocytes ont ensuite été exposées à une solution commerciale diluée de lectines conjuguées à la fluorescéine (Vectorlab) : Peanut Agglutinin (PNA ; FL-1071), Soybean Agglutinin (SBA ; FL-1011) ou Weat Germ Agglutinin (WGA ; FL-1021) dont la dilution était 1 : 400 μL pour le SBA et le PNA ainsi que de 1 : 4800 μL de WGA. Les cellules ont été exposées à chacune des lectines (utilisées individuellement) durant 35 minutes à l'obscurité et température pièce, puis elles ont été lavées avec le tampon Lectine. Un témoin négatif (contrôle) a également subi cette même exposition mais avec du tampon seulement. Une dernière centrifugation (300 g ; 10 minutes) a permis d'éliminer les lectines non liées. Le surnageant a été éliminé puis un volume minimal de tampon Lectine a été ajouté (300 μl) pour remettre les hémocytes en suspension. Cette dernière resuspension des cellules a été suivie de leur examen en cytométrie en flux.

Examen des hémocytes au cytomètre en flux

Les échantillons ont été examinés au cytomètre pour comparer chaque lectine avec un témoin négatif, en présence et en absence de l'inhibiteur spécifique de la lectine utilisée pour le phénotypage. La figure 9 présente les résultats bruts fournis par le logiciel lors d'un passage des cellules en cytofluorométrie. Un premier graphique **A** présente la complexité relative des cellules (Side scatter height SSC-H) en fonction de leur taille relative (Forward scatter height FSC-H). Un second graphique **B** présente cette fois la quantité relative de fluorescence des cellules (FL1-H) en fonction de leur complexité (SSC-H) exprimée en unité arbitraire. Le troisième graphique **C** en histogramme permet de représenter le nombre de cellules selon leur quantité relative de fluorescence (FL1-H) représentée sur l'axe des abscisses. Il est possible de définir des zones à comptabiliser en y apposant des marqueurs. Le marqueur M1 représente ici une fluorescence élevée tandis que M2 représente une fluorescence faible. Ainsi, le nombre total de cellules comptabilisé ("events" sur le graphique) était de 7626 dont 6023 possèdent une fluorescence faible et seulement 8 possédaient une fluorescence forte. Ceci permet d'ajuster les paramètres du cytomètre afin que la fluorescence des

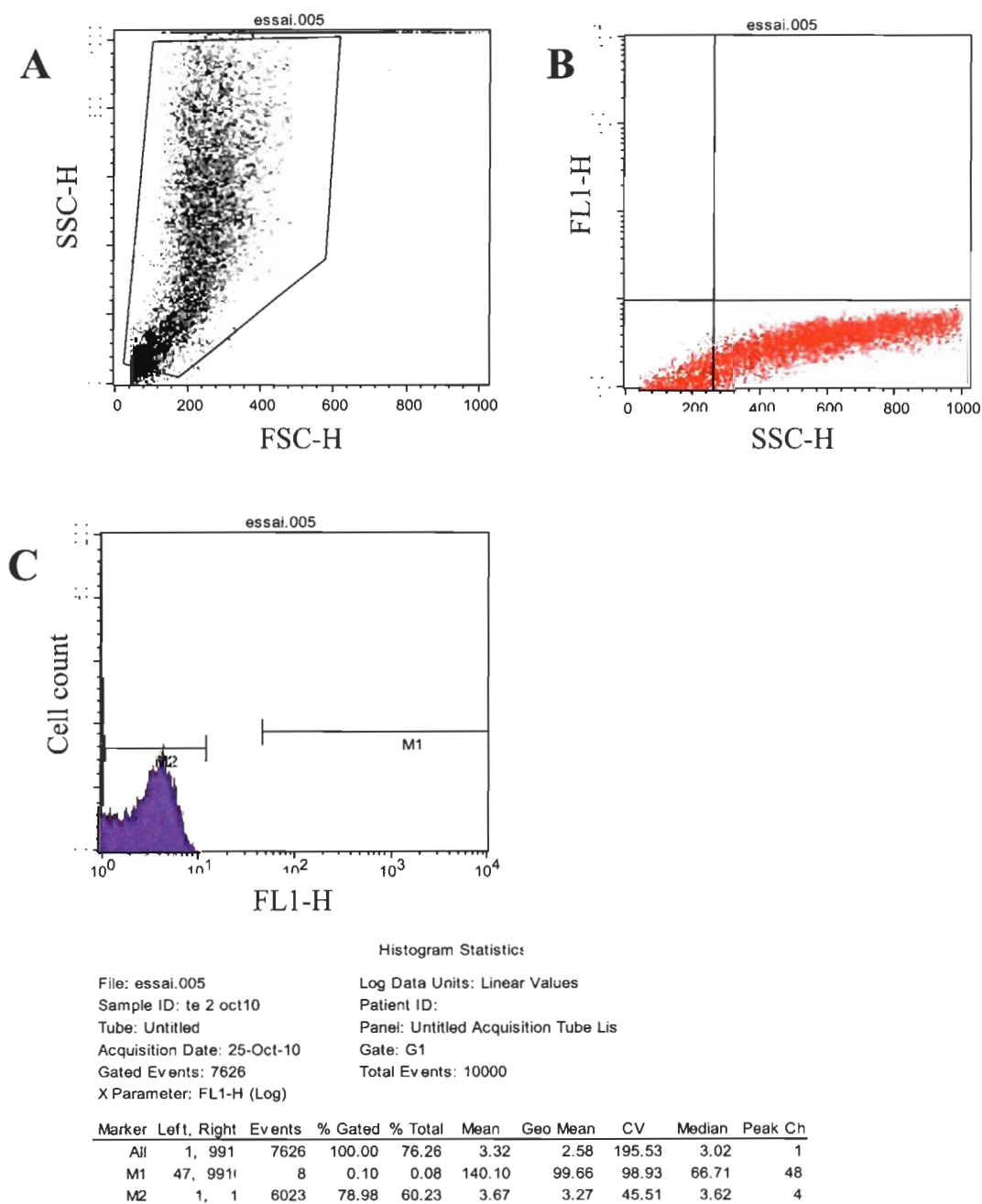


Figure 9 : Résultats bruts présentés par le logiciel de cytométrie en flux pour la quantification de l'autofluorescence (bruit de fond) des hémocytes. **A** présente SSC-H en fonction du FSC-H. **B** présente le log de FL1-H en fonction de SSC-H. **C** un histogramme représentant le nombre de cellules selon le log de FL1-H.

cellules considérées comme témoins, car non marquées, soit considérée comme étant équivalente à un bruit de fond avant les marquages. Ce paramétrage est ensuite conservé tout au long des expériences pour assurer une uniformité des résultats du fait de l'uniformité de l'autofluorescence des hémocytes. Un minimum de 8000 cellules a ainsi été enregistré pour chaque analyse en utilisant le logiciel CellQuest (Becton, Dickinson) sur un cytomètre FACSCAN (Becton, Dickinson).

Inhibition du marquage

Les inhibiteurs ont été ajoutés après l'incubation de 35 minutes dans les lectines dans l'obscurité à température pièce décrite précédemment. Pour ce faire, 500 μ L de tampon Lectine ont d'abord été ajoutés avant de laver les cellules par centrifugation (300G) et de les remettre en suspension dans 300 μ L de tampon Lectine pour s'assurer l'absence de lectines non liées. Une forte concentration de l'inhibiteur spécifique à chaque lectine a par la suite été ajoutée aux cellules. Les inhibiteurs utilisés furent N-acetylglucosamine (concentration finale 200 mM) pour SBA, D-Galactose (concentration finale 200 mM) pour PNA et Chitine Hydrolysate (concentration finale 50 mM) pour WGA. Une incubation de 10 heures dans l'obscurité à 4°C a permis d'assurer un délai suffisant pour la compétition sur le site de liaison.

Examen au microscope en épifluorescence et examen en microscopie confocale

Afin d'observer les granulocytes en lumière visible, une solution mère de Giemsa a été préparée à partir de 0.75g Giemsa en poudre mis en agitation circulaire 3 fois par jours durant 4 jours dans 65 mL de Méthanol et 65 mL Glycérol. Après filtration sur du papier Whatman #1 et une dilution 1 :10 dans de l'eau distillée, la solution a été utilisée sur une goutte de cellules traitées avec une solution de lectines en suivant le protocole initial mais sur des cellules vivantes (sans fixation des cellules). L'incubation de 30 minutes à l'obscurité a été suivie d'un rinçage abondant à l'eau distillée. Des photos de différents plans de cellules de grossissement 10x et 20x ont été prises en lumière réelle, puis en épifluorescence et enfin des cellules fluorescentes ont été examinées au confocal en

utilisant un objectif 40x afin d'obtenir des informations sur la provenance du signal fluorescent. Les photos des échantillons ont été prises avec une caméra AxioCam Mrc5. L'Axio Observer Z1 était monté sur un microscope confocal LSM700 Zeiss équipé d'une lampe épifluorescente à spectre large de marque X-Cite. Chaque tranche optique entre les cellules était espacée de 10 microns. Un plan apical représente la première tranche optique au sommet d'une cellule tandis qu'un plan basal représente la dernière tranche optique à la base de celle-ci.

Tests statistiques

Pour les tests effectués sur les données d'inhibition, une transformation en logarithme naturel des données fluorescence s'est avérée nécessaire pour diminuer la variance entre certaines données. Un test de Student T a été fait pour comparer la fluorescence des cellules marquées aux lectines à celles des mêmes cellules après l'ajout des inhibiteurs.

Pour les tests effectués sur les pourcentages de cellules de chaque type, un test de Student T a été fait pour comparer les pourcentages de granulocytes et d'hyalinocytes enregistrés dans le mois de février à ceux de mai. Aucune transformation des données n'a été nécessaire pour réaliser ces analyses statistiques.

2.3. Résultats

La figure 10 présente les résultats des tests permettant d'établir la concentration de lectines utilisée pour les essais. « C » représente la concentration optimale de lectine puisqu'une concentration plus faible « C/2 » ne permet pas de détecter un signal de fluorescence suffisamment différent du témoin et une concentration plus élevée « C*2 » engendre une fluorescence des hémocytes qui présente des écarts-types importants pour différents échantillons. Pour la SBA et la PNA, la dilution utilisée était de 1 μ L pour 400 μ L d'hémolymphes tandis que pour WGA, la dilution était de 1 μ L pour 4800 μ L.

La figure 11 présente les résultats du marquage avec les lectines suivi d'une inhibition de 12 heures dans l'obscurité à 4 °C. Les inhibitions ont engendré un signal de fluorescence significativement plus faible par rapport aux mêmes échantillons d'hémocytes sans inhibition. Le pourcentage d'inhibition observé est indiqué dans le tableau 5. L'inhibition de WGA est la plus importante avec 96.6 % d'inhibition ($P < 0.0001$), ce qui correspond à une intensité de fluorescence presque aussi faible que le témoin non stimulé, bien qu'il soit toujours significativement différent de ce dernier ($P < 0.001$). Les inhibitions de SBA et PNA sont compétitives et entraînent une diminution de fluorescence de seulement 35,3 % et 48,9% respectivement, mais ces inhibitions sont néanmoins significativement différentes du marquage aux lectines sans inhibition ($P < 0.05$ et $P < 0.0001$ respectivement).

La figure 12 présente les résultats du marquage au Giemsa et à la lectine SBA d'un même échantillon. L'image en grossissement 20x du marquage au Giemsa (A) permet de distinguer plus clairement les granules dans certains hémocytes, tandis qu'une image du même plan de cellules en fluorescence verte (B) montre le pourcentage approximatif de cellules marquées par la lectine fluorescente. Il est possible de constater que le marquage aux lectines est d'une intensité différente et que sur la figure 12.B, 7 hémocytes ont été fortement marqués, 15 autres cellules ont été plus faiblement marquées et 23 cellules ne présentent pas du tout de fluorescence et n'ont donc pas été marquées. Parmi les cellules

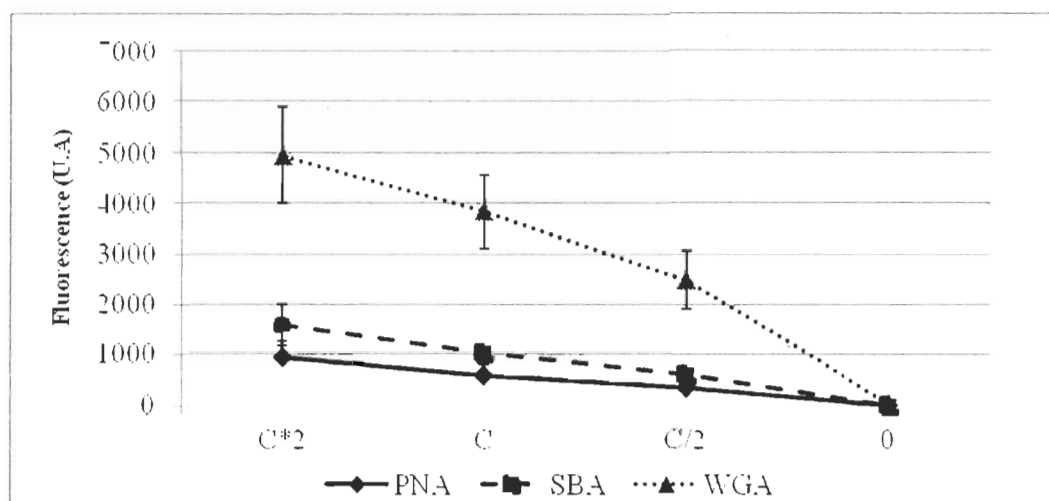


Figure 10 : Intensité (unité arbitraire de fluorescence) du marquage des hémocytes avec différentes concentrations de lectines (moyenne \pm E.T., N=5).

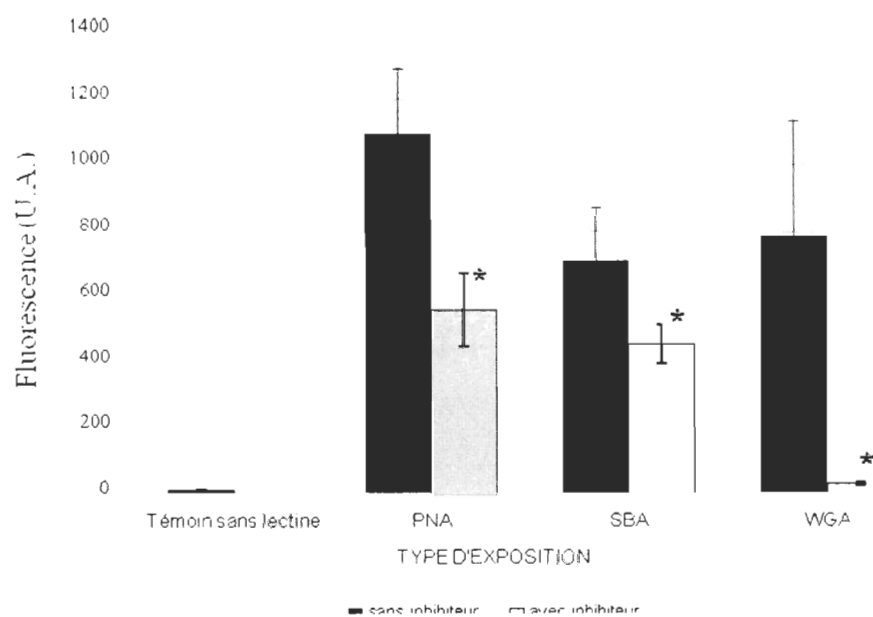


Figure 11 : Intensité (unité arbitraire de fluorescence) du marquage des hémocytes pour chaque lectine avec et sans inhibition spécifique (moyenne \pm E.T., \ast =6). indique une inhibition significative du marquage.

Tableau 5 : Pourcentages moyens d'inhibition spécifique du marquage des hémocytes avec la PNA, la SBA et la WGA.

Lectine	Pourcentage moyen d'inhibition
PNA	48,9
SBA	35,3
WGA	96,6

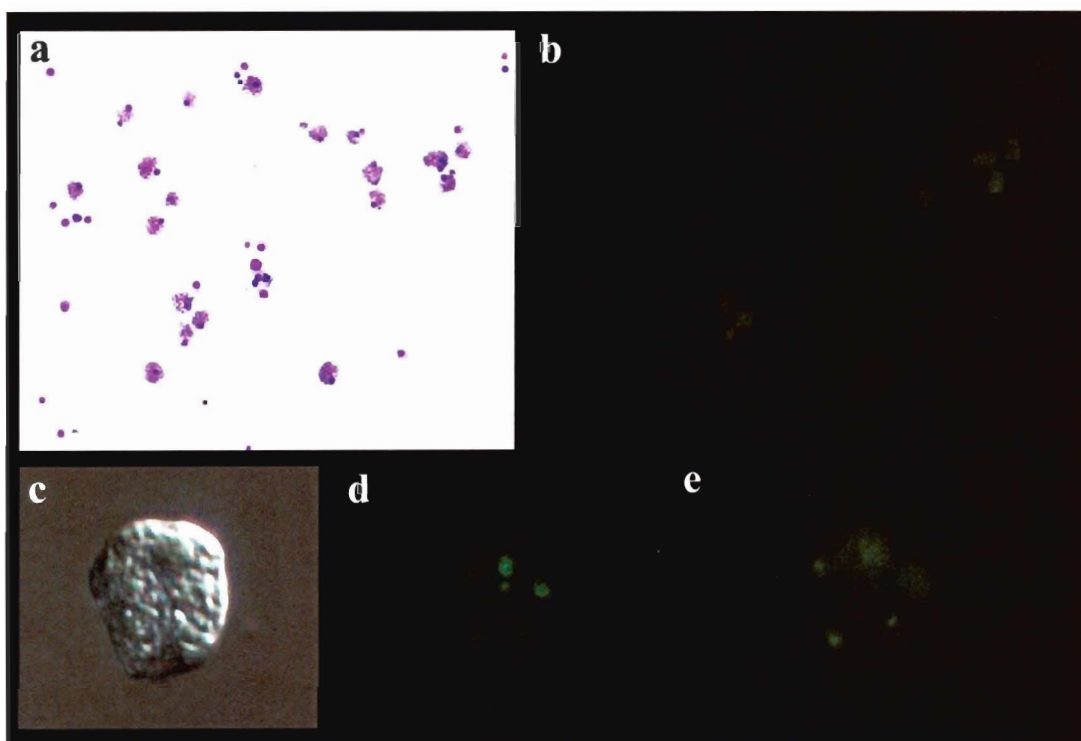


Figure 12 : Observation d'un champ d'hémocytes (x 20) marqués au Giemsa et avec la SBA **a** en lumière visible et **b** en fluorescence verte ainsi que d'un hémocyte isolé (x 40) marqué avec la SBA **c** en lumière visible et en fluorescence selon **d** un plan apical et **e** un plan basal.

marquées fortement, on distingue surtout de gros granulocytes, alors que le marquage plus faible est généralement sur des granulocytes plus petits alors que l'absence totale de marquage concerne généralement les hyalinocytes. La figure 12.C, représentant un gros hémocyte très granulaire en lumière visible, montre clairement des zones marquées à sa surface, confirmées par un passage au confocal qui a démontré la présence d'une fluorescence maximale sur les photos prises avec mise au point au niveau apical (figure 12.D) et basal (figure 12.E) de la cellule.

La figure 13 présente les résultats obtenus par l'analyse des hémocytes par cytométrie en flux. Une couleur a été attribuée à chaque point en fonction de l'intensité de sa fluorescence et enfin de situer dans le premier graphique les cellules comportant une fluorescence d'intensité plutôt faible entre 0 et 100 unités arbitraires (en vert), une fluorescence d'intensité intermédiaire entre 100 et 300 unités arbitraires (en rose) ou une fluorescence de forte intensité de plus de 300 unités arbitraires (en rouge). Sur la figure 13.A, un témoin permet de quantifier la fluorescence naturelle des hémocytes. Les cellules sont très majoritairement identifiables dans la zone de faible fluorescence. Le marquage à la SBA (Figure 13.B) et à la PNA (Figure 13.C) entraîne une augmentation de la fluorescence d'une majorité de granulocytes. Ceux-ci sont maintenant majoritairement dans la zone de fort marquage de couleur rouge, tandis que les hyalinocytes sont dans la zone de marquage faible et que quelques cellules sont dans la zone intermédiaire. Le marquage (figure 12.D) à la WGA produit une augmentation de la fluorescence chez toutes les cellules, puisque celles-ci se retrouvent entièrement dans la zone de fort marquage.

Finalement, le marquage aux lectines présenté sur la figure 14 présente un même marquage effectué dans deux périodes différentes afin d'évaluer la variation temporelle des hémocytes. Les populations d'hyalinocytes et de granulocytes sont évaluées en utilisant les lectines SBA et PNA, puisque la lectine WGA n'est pas discriminante. Les pourcentages

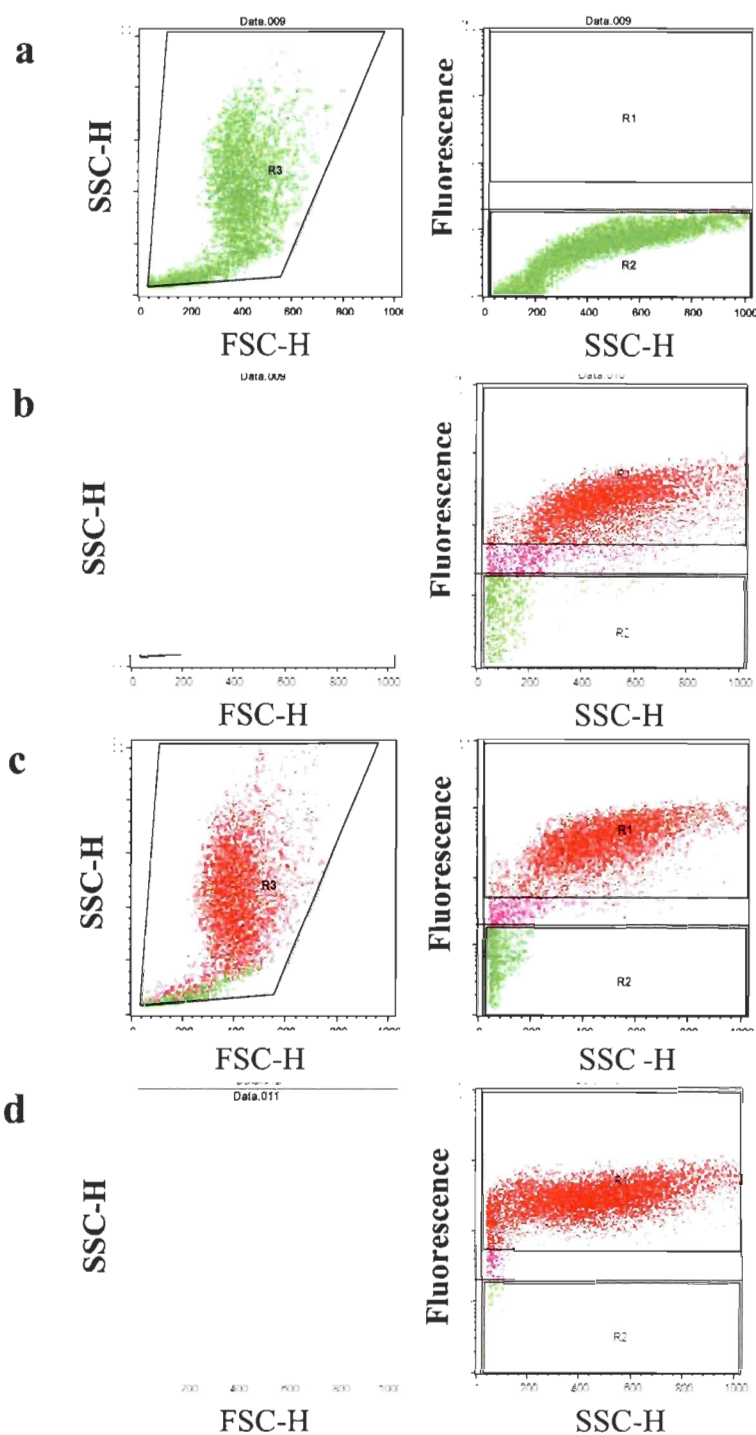


Figure 13 : Analyse par la cytométrie en flux des hémocytes avec les lectines fluorescences. **a** un témoin marquage (autofluorescence des hémocytes) **b** fluorescence induite par la liaison de la SBA, **c** fluorescence induite par la liaison de la PNA et **d** fluorescence induite par la liaison de la WGA.

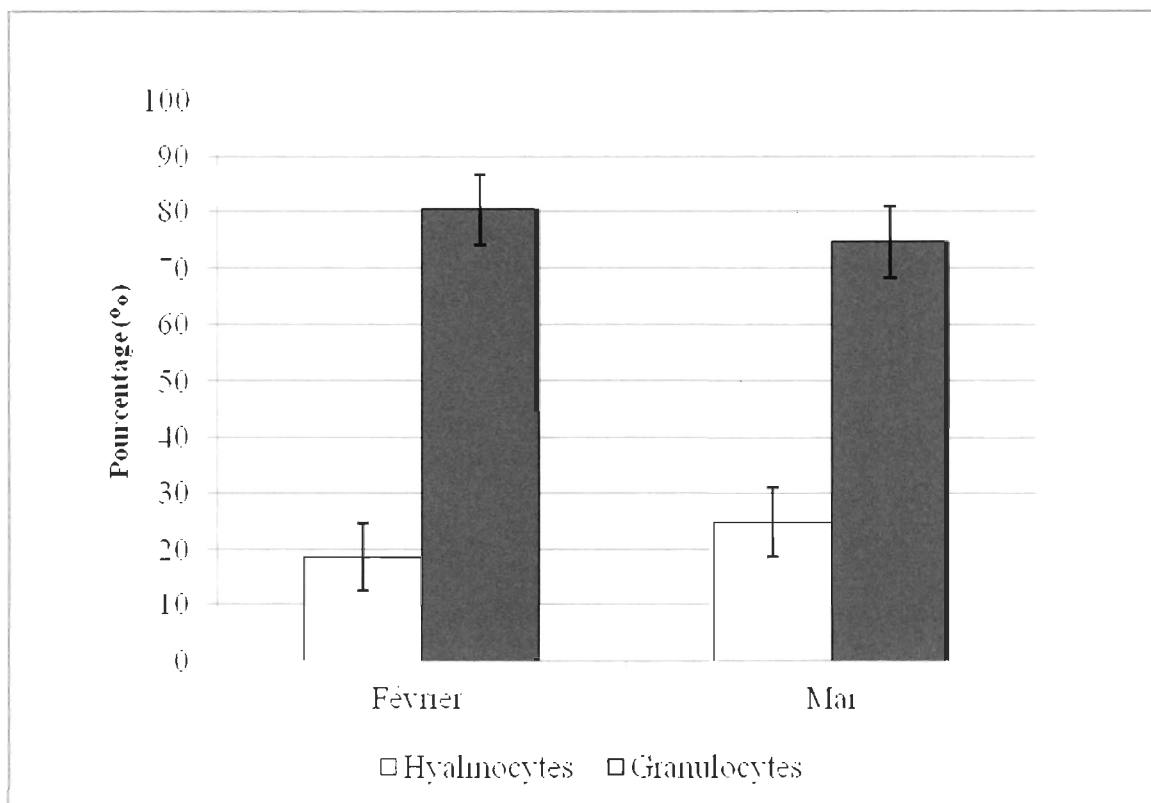


Figure 14 : Pourcentage d'hyalinocytes et de granulocytes en fonction des résultats d'un marquage par les lectines SBA et PNA en février et mai 2011 (les valeurs représentent la moyenne \pm E.T., N=5).

d'hyalinocytes sont calculés en comptabilisant les cellules possédant un marquage faible vs le nombre total de cellules. Le pourcentage moyen d'hyalinocytes est de 18,6 % en février et 24,9 % en mai tandis que la différence est attribuée aux granulocytes. Notons toutefois que ces différences n'étaient pas significatives. L'écart type entre les données est cependant plus important en février qu'en mai : 6,14 et 6,31 % contre 2,05 et 2,10 % pour les hyalinocytes et les granulocytes, respectivement. La variation interindividuelle est donc plus importante en février, bien que ces résultats ne soient pas statistiquement différents.

2.4. Discussion et conclusion

Le marquage par des lectines marqués d'un fluorochrome pourrait permettre de connaître rapidement les proportions d'hémocytes et de granulocytes lors d'analyses par cytométrie en flux. Ce phénotypage pourrait permettre de vérifier la variation temporelle des populations cellulaires une fois les concentrations en lectines déterminées et leur liaison sur les récepteurs spécifiques démontrée par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques et l'examen des cellules en microscopie confocale.

La concentration utilisée pour obtenir le même signal fluorescent dans les tests de marquage par les lectines a nécessité des concentrations beaucoup plus faibles de WGA que de SBA ou de PNA. Les caractéristiques de ces protéines, fournies par le fournisseur « Vector Laboratories », peuvent expliquer certaines de ces variations. Tout d'abord, la différence de taille de ces protéines peut avoir joué un rôle dans cette observation. En effet, WGA est une protéine de 36 kDa constituée de 2 sous unités tandis que SBA et PNA sont toutes deux composées de 4 sous-unités pour un total de respectivement 120 et 110 kDa. Une même concentration de solution de lectines concentrées pourrait donc contenir davantage de petites sous-unités WGA que de sous-unités PNA ou SBA. Cependant, la concentration de lectines utilisées pour obtenir un signal comparable était 12 fois plus faible pour WGA comparée à PNA et à SBA, ce qui représente une différence considérable. Il serait possible que *Mytilus edulis* possède davantage de récepteurs capables de lier la Chitine hydrolysate que de récepteurs pouvant lier D-galactose ou N-acetylglucosamine. En effet, des tests d'agglutination effectués pour différentes lectines à des concentrations variées donnent un signal positif à partir d'une certaine concentration et certains auteurs déduisent que la concentration à partir de laquelle ce type de réponse immunitaire est activée pourrait faire état de la concentration des récepteurs à la surface cellulaire (M'Beri et al., 1988). On pourrait également croire que l'affinité de WGA pour le récepteur liant la N-Acetylglucosamine soit nettement supérieure à celle de SBA pour le récepteur de la N-Acetylglactosamine ou à PNA pour le récepteur du D-Galactose. Il faudrait alors davantage de SBA ou de PNA pour que le même signal de fluorescence apparaisse sur les

cellules. La concentration utilisée pour chaque lectine peut aussi dépendre de l'affinité de chaque lectine pour les récepteurs cellulaires. Cette hypothèse est cependant infirmée lors de l'utilisation du sucre spécifique aux récepteurs comme inhibiteur du marquage aux lectines, puisqu'une inhibition compétitive a généré pour WGA une inhibition supérieure à 95 % sur les récepteurs. En effet, les lectines se déplacent d'une glycoprotéine à l'autre lors d'un marquage, tandis que le sucre spécifique lui reste bien accroché à la glycoprotéine (Dam et Brewer, 2010). Ce type de marquage explique que le sucre spécifique arrive à déloger quasi la totalité des récepteurs. Pour que l'inhibition fonctionne avec une telle efficacité, il doit cependant y avoir une plus grande affinité pour le sucre naturel que pour la lectine. Les inhibitions du PNA et du SBA sont beaucoup moins efficaces, puisque moins de 50 % du marquage est inhibé par de grandes quantités du sucre inhibiteur. Il est possible de déduire par ces observations que soit l'affinité de ces lectines comprend plus d'un récepteur spécifique, soit leur affinité au récepteur est supérieure et donc équivalente à celle du sucre spécifique. Il existe aussi une variabilité interspécifique quant à la capacité de liaison des lectines aux hémocytes (Tunkijjanukij et Olafsen, 1998). Des variations concernant les récepteurs présents ainsi que de légères différences dans les chaînes protéiques des récepteurs pourraient expliquer les différentes affinités entre les espèces.

L'examen des cellules en microscopie confocale montre que le marquage au SBA se produit majoritairement sur des cellules comportant des granules. Le marquage au Giemsa en lumière visible montrait une majorité de granulocytes et les hyalinocytes présents sur l'image ne sont pas visibles en épifluorescence, ce qui semble confirmer un marquage différentiel des hémocytes avec la SBA. Un marquage beaucoup plus faible est cependant observable sur certains granulocytes, ce qui pourrait représenter une population intermédiaire. Lors du marquage au confocal avec des cellules vivantes, la liaison des lectines sur les sites a été observée. Si les lectines avaient été à l'intérieur des cellules, l'examen du plan basal et apical des cellules aurait révélé un marquage dans les photos présentant les couches intermédiaires des cellules tandis qu'ici seules les couches supérieures et inférieures présentaient une image claire des zones fluorescentes (Fig.12 d et

e). Un marquage similaire a été démontré pour le PNA tandis que le marquage au WGA ne montrait pas de différence dans les types cellulaires et permettra donc d'établir un témoin positif du marquage au cytomètre (pas d'images disponibles).

Le marquage des lectines SBA et PNA en cytométrie en flux a montré une fluorescence environ 100 fois plus élevée pour la plupart des granulocytes (la région 1 sur la figure 13). Les hyalinocytes quant à eux sont majoritairement dans la zone de fluorescence naturelle des témoins (zone de faible fluorescence marquant les cellules en vert). Certaines cellules sont dans une zone de fluorescence intermédiaire. Il pourrait s'agir d'une population intermédiaire de granulocytes, moins complexe et plus petite que la majorité des granulocytes. Cette population intermédiaire est parfois observée en cytométrie et certains auteurs la considèrent comme différente de la population de granulocytes de taille plus importante (Cheng et al., 1980; Parisi et al., 2008). Le marquage au WGA montre quant à lui une augmentation de la fluorescence identique pour les deux types cellulaires. Toutes les cellules se retrouvent dans la zone de forte fluorescence. Son utilisation ne permet donc pas de différencier les deux populations cellulaires, mais il peut néanmoins agir en tant que contrôle positif du marquage. Le site de liaison de la chitine hydrolysate se trouve donc sur les deux types cellulaires, tandis que ceux du D-galactose ou du N-acetylglucosamine se trouvent uniquement chez les granulocytes. La fixation d'une lectine sur les glycoprotéines à la surface des cellules peut avoir une variété d'effets, incluant l'agrégation ainsi que des signaux de transduction et des interactions protéines/protéines (Dam et Brewer, 2010). Les granulocytes participant plus activement à la défense de l'organisme en cas d'intrusion, notamment par leur rôle accru pour la phagocytose ou la sécrétion de peptides antimicrobiens, leur surface devrait posséder davantage de ces sites de liaisons. Un site de liaison présent uniquement sur les hyalinocytes pourrait être intéressant car son étude permettrait de mieux définir leur rôle.

Finalement, le suivi des populations hématocytaires pour les mois de février et de mai montre de 74 à 81 % de granulocytes contre 19 à 26 % d'hyalinocytes, avec un maximum

d'hyalinocytes en mai. Les proportions de chaque type cellulaire sont habituellement évaluées autour de 70 % pour les granulocytes et 30 % pour les hyalinocytes, avec des valeurs plus élevées au printemps pour les hyalinocytes (Santarem et al., 1994; Bettencourt et al., 2009). L'évaluation par le phénotypage des lectines correspond donc sensiblement à ce qui devrait être observé. Concernant la légère baisse de granulocytes en mai par rapport au mois de février, il est possible que les proportions cellulaires soient modifiées durant la gamétogénèse, comme c'est le cas lors d'infections (Cochennec-Laureau et al., 2003). Une migration des hémocytes vers le manteau leur permettrait de participer à la protection des gamètes et possiblement d'augmenter leur apport en nutriments (Moore and Lowe, 1977, Thompson, 1977). Une observation plus précise de la proportion des types cellulaires durant les phases de la gamétogénèse permettrait peut-être d'étayer cette hypothèse.

Le phénotypage des types cellulaires par le marquage des récepteurs en utilisant des lectines chez la moule *Mytilus edulis* est donc une méthode envisageable pour des études ultérieures. Notre étude, en utilisant les lectines SBA et PNA comme marqueurs spécifiques des granulocytes et la lectine WGA comme marqueur positif des cellules, montre qu'il est possible de suivre les variations quantitatives des types cellulaires en fonction de différentes périodes d'échantillonnage et présente un protocole optimisé pour ce type d'étude. Cette variation serait intéressante à mesurer tout au long du cycle reproducteur puisque celui-ci peut potentiellement l'influencer. Il convient de tester la variation des populations cellulaires dans un contexte de suivi des capacités immunitaires puisque la variation des pourcentages de chaque type cellulaire peut influencer grandement les mesures de l'activité d'une fonction spécifique à un type cellulaire telle que la capacité phagocytaire ou la production de peptides antimicrobiens. Aucune des lectines choisies ne présente cependant un marquage spécifique aux hyalinocytes, et la population de granulocytes présente un marquage réduit pour certaines cellules, allant dans le sens d'une population intermédiaire de granulocytes, plus petits et contenant moins de sites de liaisons. Un simple passage des échantillons au cytomètre ne permet toutefois pas toujours leur observation. S'agit-il d'une population possédant une fonction propre particulière ou

simplement de granulocytes immatures? Quelle est la fonction principale des hyalinocytes? En effet, la phylogénie de ces cellules reste incomprise, et si la théorie la plus courante propose des lignées cellulaires différentes pour les hyalinocytes et granulocytes, plusieurs chercheurs proposent également que les hyalinocytes sont des granulocytes immatures. Des études approfondies des récepteurs membranaires présents permettraient sans doute d'obtenir des pistes de réflexion intéressantes à ce sujet, par exemple par l'utilisation d'anticorps spécifiques pour préciser les recherches. Certains anticorps monoclonaux ont été synthétisés afin de permettre de suivre la distribution des hémocytes dans les tissus ainsi que leur proportions chez des huîtres (*Ostrea edulis*) en développement (Xue et Renault, 2001). Des techniques d'immunohistochimie combinées à ce type d'étude chez *Mytilus edulis* permettrait une compréhension accrue du développement et de la fonction des différents types hémocytaires.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Interprétation de l'ensemble des résultats

Afin de poursuivre l'interprétation des résultats de ce projet de maîtrise, il est nécessaire de combiner les résultats fournis par l'ensemble de la recherche. Le phénotypage des populations cellulaires effectué en février et mai permet ainsi d'étoffer l'analyse de l'immunité cellulaire effectuée durant ces deux périodes. Tout d'abord, le marquage des hémocytes par les lectines indique qu'un maximum d'hyalinocytes se trouvait dans les échantillons du mois de mai et donc inversement que les proportions de granulocytes dans ces échantillons étaient plus faibles. Ces données permettent de contredire l'hypothèse cherchant à imputer l'augmentation de l'index phagocytaire de 48 % à 52 % entre février et mai à l'augmentation de la proportion de granulocytes, puisque selon ces analyses, ce sont les hyalinocytes qui augmentent en proportion durant cette période. Ainsi, bien que les granulocytes étaient moins nombreux, ils auraient été plus compétents pour ce qui est de leur capacité phagocytaire en mai. Ces résultats confirment l'importance de l'apport énergétique au système immunitaire et indiquent qu'au début de la gamétogénèse, alors que les eaux sont plus froides et la filtration moins active, les hémocytes sont moins efficaces pour défendre l'organisme (Delaporte et al., 2006).

Ces résultats pourraient aussi indiquer, si l'on considère également les comptes cellulaires enregistrés pour ces périodes, que la diminution du compte cellulaire observé en mai par rapport à février est quasi entièrement imputable à des granulocytes. Une baisse des cellules de 470 000 à 450 000 est relativement faible. Cependant, si les proportions de

granulocytes : hyalinocytes étaient de l'ordre de 81 : 19 en février et de 74 : 26 en mai, il y aurait environ 381 000 granulocytes en circulation en février. Ce nombre diminuerait à 333 000 tandis qu'il passerait de 89 000 à 117 000 en février. Il est très probable qu'il y ait eu une migration importante des granulocytes dans les tissus. Les granulocytes ont pour fonction la protection ou la nutrition des gamètes, il est possible que la diminution de leur nombre dans nos échantillons du mois de mai soit causée par leur migration vers le manteau ou vers les gonades (Cochennec-Laureau et al., 2003, Moore et Lowe, 1977). La quantification des cellules immunitaires dans le manteau durant ces périodes pourrait permettre de valider cette hypothèse.

Le suivi des populations cellulaires conjointement à une analyse des capacités du système immunitaire est donc très pertinent puisque ces analyses permettraient de mieux comprendre les dynamiques qui gèrent les types cellulaires, en ce qui concerne par exemple leur phylogénie ainsi que l'hématopoïèse. En effet, un suivi temporel des comptes cellulaires et des proportions cellulaires dans l'hémolymphe et dans les tissus à la suite d'une infection *in vivo* serait une étape indispensable à la compréhension de la phylogénie des hémocytes chez les moules, qui demeure encore peu comprise. De même, cette approche permettrait de mieux comprendre le processus d'hématopoïèse chez la moule, en suivant l'augmentation des populations cellulaires. En effet, si les hyalinocytes sont des granulocytes immatures, alors leur augmentation dans le temps sera suivie d'une augmentation des granulocytes. Par contre si les deux processus sont séparés, ce patron ne sera pas observé.

Apports et limites de la recherche

Ce projet a été réalisé dans le cadre d'une collaboration transatlantique visant à mieux comprendre l'immunocompétence de la moule bleue par l'identification de l'ensemble de ses effecteurs et leur voie de contrôle. L'immunocompétence a été particulièrement étudiée en fonction du stade de développement des moules, en fonction d'une variation temporelle et en réponse à des infections bactériennes. L'étude de la variation de la compétence

immunitaire d'une population de *Mytilus edulis* se révèle essentielle. Il faut cependant d'abord connaître le fonctionnement, les limites et la variation de l'immunocompétence des bivalves avant de pouvoir reconnaître les éléments qui peuvent le perturber.

L'étude du système immunitaire de la moule implique la mesure de nombreux paramètres. Cependant, celui-ci est très complexe et parmi ces paramètres nombre d'entre eux sont imbriqués les uns dans les autres pour la défense de l'organisme. Il apparaît de plus en plus évident que des évaluations globales de ce système devraient être faites. À titre d'exemple, la flambée oxydative agit en conjonction avec la phagocytose et peut être inhibée par la production d'antioxydants. Chacun de ces paramètres est souvent mesuré seul, alors que la phagocytose sans production de flambée oxydative implique l'ingestion de bactéries par les hémocytes sans leur destruction (Donaghy et al., 2009). De même, une production excessive de réactifs d'oxygène par rapport à la capacité de neutralisation par les antioxydants peut générer une toxicité et des dommages cellulaires (Kaloyianni et al., 2009). Par contre, lorsque tous ces paramètres sont fonctionnels, les hémocytes jouent le rôle de puissantes machines de guerre pour contrer l'invasion de corps étrangers.

L'étude de la variation saisonnière de ce système est également d'une importance cruciale, puisque ceci permet de connaître ces périodes de vulnérabilité. La gamétogénèse et les variations de température de l'eau durant les saisons québécoises constituaient des sources potentielles de stress. La plupart des études sur la variation saisonnière du système immunitaire ont généralement échantillonnées des moules uniquement durant la période estivale. Ce choix est justifiable par le fait que les plus gros épisodes de mortalités chez les bivalves se produisent à cette période de l'année, quand la température de l'eau est maximale et la libération des gamètes consomme une grande quantité d'énergie, au détriment des autres fonctions physiologiques (Soletchnik et al., 2007). Cependant, il est possible que les vulnérabilités du système immunitaire apparaissent antérieurement à la ponte et qu'il n'y ait tout simplement aucune possibilité de récupération avant la fin du cycle reproducteur.

Ce projet apparaît donc comme l'aboutissement de toutes ces problématiques. Il a permis de faire le point sur les techniques utilisées pour l'analyse du système immunitaire et les a placées dans un même contexte, soit une analyse de la variation saisonnière de l'immunité en utilisant des moules du large des îles de la Madeleine considérées comme saines et aptes à se défendre. L'analyse des glycoprotéines de surface par le marquage aux lectines a également permis de donner des pistes de solutions pour faciliter le phénotypage des types cellulaires. Bien que ce marquage n'ait pu être effectué en octobre, il fournit néanmoins des informations pouvant avoir des répercussions intéressantes sur les études du suivi du système immunitaire. La principale préoccupation qui ressort de ce projet est la nécessité d'étudier de manière plus globale la défense des organismes à cause de la complexité de chacun des paramètres du système immunitaire et de l'impact que ceux-ci ont les uns sur les autres. Il a été démontré qu'il est possible d'effectuer différentes analyses sur un même groupe d'études. C'est ce type de travaux qui est nécessaire à la compréhension du système immunitaire de la moule à ce stade des recherches. Même si globalement, il n'est pas possible de tirer de conclusions hâtives sur l'état des organismes que nous avons étudiés, ce projet démontre qu'il existe une importante variation du système immunitaire chez la moule bleue.

Parmi les difficultés rencontrées lors de ce projet, l'une des plus contraignantes a été la réaction de stress générée par le transport des organismes. En effet, les moules arrivaient au laboratoire après une exposition d'environ 24 heures à l'air sur glace. Afin de mesurer l'immunocompétence la plus près possible des moules en milieu naturel, cette étude cherchait au départ à mesurer l'état des moules dès leur arrivée. Mais il était rapidement apparu que les moules avaient besoin d'un temps de repos de plusieurs jours nécessaire à leur rétablissement des perturbations dues au transport. Des recherches ont montré que des expositions à l'air, même pour une courte durée, pourraient augmenter la réponse immunitaire et que plus la durée était longue, plus la stabilité des membranes lysosomales était compromise (Zhang et al., 2006; Malagoli et al., 2007). Le temps de récupération de plusieurs jours était donc nécessaire à un échantillonnage représentatif des capacités

immunitaires en milieu naturel. Ces problèmes ainsi que des retards dans les optimisations des protocoles ont affecté le nombre de traitements possible pour les analyses. Il a été planifié d'obtenir des mesures mensuelles sur différents groupes de moules afin d'avoir une évolution graduelle des paramètres et, si leurs valeurs étaient suffisamment semblables au point de vue des statistiques, il aurait été possible de grouper les données et ainsi d'obtenir un « N » plus grand et des valeurs plus fiables. En effet, des études saisonnières montraient très peu de variation entre les différents mois, mais montraient uniquement des différences dans l'aspect saisonnier. Cette opportunité de grouper certaines données aurait pu donner plus de poids à notre expérience, mais les difficultés techniques rencontrées se sont avérées une entrave majeure à cette possibilité. La meilleure solution à la plupart des problèmes rencontrés durant l'étude serait l'utilisation d'un laboratoire situé le plus près possible du site de récolte.

Perspectives

Plusieurs pistes de réflexion sont abordées durant cette recherche pour guider d'autres auteurs vers des études semblables. L'un des points principaux abordés demeure l'étude des différents aspects de l'immunité de manière conjointe afin d'obtenir une évaluation plus globale de l'état de santé du système immunitaire des moules étudiées. Les études conjointes de la phagocytose, de la production de ROS et NOx avec la production d'antioxydants sont fortement à considérer. Cette étude propose également un système simple afin d'établir les proportions des deux types de cellules, soit les hyalinocytes et granulocytes. Son utilisation est suggérée pour toute analyse des capacités cellulaires, étant donné les différentes propriétés des granulocytes et hyalinocytes. Par exemple, puisque la très grande majorité des cellules phagocytaires sont des granulocytes, une variation des proportions granulocytes : hyalinocytes peut fournir des explications quant à la diminution d'un index phagocytaire dans le temps ou encore expliquer les différences observées entre les individus.

Des études saisonnières mettant en contexte des moules soumises à des conditions hivernales pourront également utiliser cette étude de manière comparative. Très peu d'études se sont intéressées à des moules provenant de zones où la température de l'eau approche les -2 °C en hiver et montant jusqu'à près de 20 °C en été. Il est possible que ces variations de température affectent les moules en ayant un effet sur l'activité de certaines enzymes, puisque de nombreux auteurs ont rapporté un lien positif entre la température de l'eau et l'activité enzymatique, notamment en ce qui concerne l'activité de l'enzyme antioxydante Catalase. Il serait pertinent de connaître l'effet de ces importantes variations de température sur l'immunité de la moule bleue.

Finalement, des études sur les effets à long terme de contaminants en milieu naturel pourront également utiliser des méthodes semblables. Les contaminants peuvent migrer et agir différemment selon l'endroit où ils s'accumulent (dans la colonne d'eau ou dans les sédiments). Les variations de température pourraient également jouer un rôle dans la répartition et le mode d'absorption de ces contaminants dans les organismes. Une étude sur les variations annuelles du système immunitaire pourrait donc être intéressante en milieu contaminé ou simplement à proximité des zones anthropiques où la matière organique peut modifier certains facteurs, dont les apports énergétiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adema, C. M., W. P. W. Van der Knapp and T. Sminia. 1991. Molluscan hemocyte-mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. Reviews in Aquatic Sciences, **4**: 201-223.
- Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. Methods in Enzymology, **105**: 121-126.
- Arumugam, M., B. Romestand, J. Torreilles and P. Roch. 2000. *In vitro* production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. European Journal of Cell Biology, **79**: 513-519.
- Auffret, M. (1988). Bivalve Hemocyte Morphology. American Fisheries Society, **18**: 169-177.
- Auffret, M., S. Rousseau, I. Boutet, A. Tanguy, J. Baron, D. Moraga and M. Duchemin. 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. Ecotoxicology and Environmental Safety, **63**: 393-405.
- Banakou, E. and S. Dailianis. 2010. Involvement of Na⁺/H⁺ exchanger and respiratory burst enzymes NADPH oxidase and NO synthase, in Cd-induced lipid peroxidation and DNA damage in haemocytes of mussels. Comparative Biochemistry and Physiology - Part C **152**: 346-352.
- Bayne, C. J., M. N. Moore, T. H. Carefoot and R. J. Thompson. 1979. Hemolymph functions in *Mytilus californianus*: the cytochemistry of hemocytes and their responses to foreign implants and hemolymph factors in phagocytosis. Journal of Invertebrate Pathology, **34**: 1-20.
- Beaz-Hidalgo, R., S. Balboa, J. L. Romalde and M. J. Figueras. 2010. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve mollusc. Environmental Microbiology Reports, **2**: 34-43.

- Beckman, J. S., T. W. Beckman, J. Chien, P. A. Marshall and B.A Freeman. 1990. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite : implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. Proceedings of the National Academy of Sciences. **87**: 1620-1624.
- Bettencourt, R., P. Dando, P. Collins, V. Costa, B. Allam and R.S. Santos. 2009. Innate immunity in the deep sea hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A. **152**: 278-289.
- Biswaranjan, P. and G. B. N. Chainy. 2010. Antioxidant defenses and oxidative stress parameters in tissues of mud crab (*Scylla serrata*) with reference to changing salinity. Comparative Biochemistry and Physiology - Part C. **151**: 142-151.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Analytical Chemistry. **72**: 249-251.
- Brousseau, P., J. Pellerin, Y. Morin, D. Cyr, B. Blakley, H. Boermans and M. Fournier. 2000. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following *in vitro* exposure to heavy metals. Toxicology. **142**: 145-156.
- Buggé, D. M., H. Hégaret, G. H. Wikfors and B. Allam. 2007. Oxidative burst in hard clam (*Mercenaria mercenaria*) haemocytes. Fish and Shellfish Immunology. **23**: 188-196.
- Bussell, J. A., E. A. Gidman, D. R. Causton, D. Gwynn-Jones, S. K. Malham, L. M. Jones, B. Reynolds and R. Seed. 2008. Changes in the immune response and metabolic fingerprint of the mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus) in response to lowered salinity and physical stress. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. **358**: 78-85.
- Campa-Córdova, A. I., N. Y. Hernández-Saavedra, R. De Philippis and F. Ascencio. 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to [beta]-glucan and sulphated polysaccharide. Fish and Shellfish Immunology. **12**: 353-366.
- Cao, A., A. Novás, J. I. Ramos-Martínez and R. Barcia. 2007. Seasonal variations in haemocyte response in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Aquaculture. **263**: 310-319.

- Carballal, M. J., C. Lopez, A. C. and A. Villalba. 1997a. Enzymes involved in defense functions of hemocytes of mussel *Mytilus galloprovincialis*. Journal of Invertebrate Pathology. **70**: 96-105.
- Carballal, M. J., C. M. Lopez, C. Azevedo and A. Villalba. 1997b. Hemolymph cell types of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Diseases of aquatic organisms. **29**: 127-135.
- Carballal, M. J., A. Villalba and C. Lopez. 1998. Seasonal variation and effects of age, food availability, size, gonadal development and parasitism on the hemogram of *Mytilus galloprovincialis*. Journal of Invertebrate Pathology. **72**: 304-312.
- Charlet, M., S. Chernysh, H. Philippe, C. Hetru, J. A. Hoffmann and P. Bulet. 1996. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. Journal of Biological Chemistry. **271**: 21808-21813.
- Cheng, T. C. 1981. Bivalves in Invertebrate blood cells. N. A. Ratcliffe and A. F. Rowley, Eds. Academic press. New York / London. 641 p.
- Cheng, T. C. and J. C. U. Downs. 1988. Intracellular acid phosphatase and lysozyme levels in subpopulations of oyster, *Crassostrea virginica*, hemocytes. Journal of Invertebrate Pathology. **52**: 163-167.
- Cheng, T. C., J. W. Huang, H. Karadogan, L. Renwanz and T. P. Yoshino. 1980. Separation of oyster hemocytes by density gradient centrifugation and identification of their surface receptors'. Journal of Invertebrate Pathology. **36**: 35-40.
- Cheng, T. C., J. J. Manzi and V. G. J. Burrell. 1995. Differences in lectin-binding by hemocytes of oysters (*Crassostrea virginica*) from three regions and further evidence for the correlation between the presence of lathyrose and the absence of *Haplosporidium nelsoni*. Journal of shellfish Research. **14**: 477-481.
- Cheng, W., I. Hsiao, C. Hsu and J. Chen. 2004. Change in water temperature on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish and Shellfish Immunology. **17**: 235-243.
- Chu, F. L. 1988. Humoral defense factors in marine bivalves. American Fisheries Society. **18**: 178-188.

- Cochennec-Laureau, N., M. Auffret, T. Renault and A. Langlade. 2003. Changes in circulating and tissue-infiltrating hemocyte parameters of European flat oysters, *Ostrea edulis*, naturally infected with *Bonamia ostreae*. Journal of Invertebrate Pathology. **83**: 23-30.
- Coles, J. A. and R. K. Pipe. 1994. Phenoloxidase activity in the haemolymph and haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Fish and Shellfish Immunology. **4**: 337-352.
- Conte, A. and E. Ottavini 1995. Nitric oxide synthase activity in molluscan hemocytes. Federation of European Biochemical Societies Letters. **365**: 120-124.
- Costa, M. M., B. Novoa and A. Figueras. 2008. Influence of Beta-glucans on the immune responses of carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). Fish and Shellfish Immunology. **24**: 498-505.
- Costa, M. M., M. Prado-Alvarez, C. Gestal, H. Li, P. Roch, B. Novoa and A. Figueras. 2009. Functional and molecular immune response of mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) haemocytes against pathogen-associated molecular patterns and bacteria. Fish and Shellfish Immunology. **26**: 515-523.
- Comité sectoriel de main-d'œuvre des pêches maritimes, Ministère de l'agriculture, des pêcheries et de l'alimentation, Regroupement des mariculteurs du Québec and Société de développement de l'industrie maricole. 2007. L'état de la mariculture au Québec. 36 p.
- Dam, T. K. and F. Brewer. 2010. Multivalent lectin, carbohydrate interactions: energetics and mechanisms of binding. Advances in carbohydrate Chemistry. **63**: 139-164.
- de Almeida, A. E., A. C. Dias Bainy, A. P. de Melo Loureiro, G. R. Martinez, S. Miyamoto, J. Onuki, L. Fujita Barbosa, C. C. M. Garcia, F. Manso Prado, G. E. Ronsein, C. A. Sigoio, C. B. Brochini, A. M. Gracioso Martins, M. H. Gennari de Medeiros and P. Di Mascio. 2007. Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian Marine environment : antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A. **146**: 588-600.

- Delaporte, M., P. Soudant, C. Lambert, J. Moal, S. Pouvreau and J. Samain. 2006. Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. Aquaculture. **254**: 571-582.
- Delaporte, M., P. Soudant, J. Moal, C. Lambert, C. Quéré, P. Miner, G. Choquet, C. Paillard and J. Samain. 2003. Effect of a mono-specific algal diet on immune functions in two bivalve species – *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. The Journal of Experimental Biology. **206**: 3053-3064.
- Dellali, M., M. Romeo and P. Aissa. 2001. Suivi annuel de l'activité catalase chez des moules et des palourdes originaires de la lagune de Bizerte. Oceanologica Acta. **24**: 263-271.
- Donaghy, L., C. Lambert, K. S. Choi and P. Soudant. 2009. Hemocytes of the carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) and the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Current knowledge and future prospects. Aquaculture. **297**: 10-24.
- Donald, K. M., A. J. Day, G. R. Smerdon, L. J. Cross and A. J. S. Hawkins. 2003. Quantification of gene transcription and enzyme activity for functionally important proteolytic enzymes during early development in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. Comparative Biochemistry and Physiology - Part B. **136**: 383-392.
- Duchemin, M. B., M. Auffret, N. Wessel, M. Fortier, Y. Morin, J. Pellerin and M. Fournier. 2008. Multiple experimental approaches of immunotoxic effects of mercury chloride in the blue mussel, *Mytilus edulis*, through in vivo, in tubo and in vitro exposures. Environmental Pollution. **153**: 416-423.
- Duchemin, M. B., M. Fournier and M. Auffret. 2007. Seasonal variations of immune parameters in diploid and triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture. **264**: 73-81.
- Feng, S. 1988. Cellular defense mechanism of oysters and mussels. American Fisheries Society. **18**: 153-168.
- Fisher, W. S., M. M. Chintala and M. A. Molinel. 1989. Annual variation of estuarine and oceanic oyster *Crassostrea virginica* Gmelin hemocyte capacity. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. **127**: 105-120.

- Ford, S. E., S. A. Kanaley and D. T. J. Littlewood. 1993. Cellular responses of oysters infected with *Haplosporidium nelsoni*: changes in circulating and tissue-infiltrating hemocytes. Journal of Invertebrate Pathology. **61**: 49-57.
- Fournier, M., J. Pellerin, Y. Clermont, Y. Morin and P. Brousseau. 2001. Effects of in vivo exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes. Toxicology. **161**: 201-211.
- Franchini, A., P. Fontanili and E. Ottavini. 1995. Invertebrate immunocytes: relationship between phagocytosis and nitric oxide production. Comparative Biochemistry and Physiology - Part B. **110**: 403-407.
- Gauthier-Clerc, S., G. Tita, F. Bourque, R. Tremblay, J. Pellerin, M. Fournier, R. St-Louis, É. Pelletier. 2007. Comparaison de la gamétogenèse de la moule bleue (*Mytilus edulis*) en mer et en lagune aux Îles-de-la-madeleine. Rapport remis à : Mme Ginette Lévesque ; 28 p.
- Gauthier-Clerc, S., M. Fortier, M. Fournier, J. Pellerin and M. Lagacé. 2009. Flow Cytometry as a Tool to Study Immunocompetency in *Placopecten magellanicus*. Bulletin of the Aquaculture Association of Canada. **107**: 36-41.
- Gauthier, J. D., J. A. Jenkins and J. F. La Peyre. 2004. Flow cytometric analysis of lectin binding to in vitro-cultured *Perkinsus marinus* surface carbohydrates. Journal of Parasitology. **90**: 446-454.
- Genthner, F. J., A. K. Volety, L. M. Oliver and W. Fisher. 1999. Factors Influencing *In Vitro* Killing of Bacteria by Hemocytes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*). Applied and Environmental Microbiology. **65**: 3015-3020.
- Goedken, M. and S. De Guise. 2004. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. Fish & Shellfish Immunology. **16**: 539-552.
- Gonzalez, M., B. Romestand, J. Fievet, A. Huvet, M. Lebart, Y. Gueguen and E. Bachere. 2005. Evidence in oyster of a plasma extracellular superoxide dismutase which binds LPS. Biochemical and Biophysical Research Communications. **338**: 1089-1097.
- Gupta, A. P., S. D. Orenberg, Y. T. Das and S. K. Chattopadhyay. 1991. Lectin-binding receptors, Na⁺,K⁺-ATPase, and acetylcholinesterase on immunocyte plasma membrane of *Limulus polyphemus*. Experimental Cell Research. **194**: 83-89.

- Hauton, C., L. E. Hawkins and S. Hutchinson. 1998. The use of the neutral red retention assay to examine the effects of temperature and salinity on haemocytes of the European flat oyster *Ostrea edulis*. Comparative Biochemistry and Physiology - Part B, **119**: 619-623.
- Hégaret, H., G. H. Wikfors and P. Soudant. 2003a. Flow-cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation I. Haemocyte types and morphology. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, **293**: 237-248.
- Hégaret, H., G. H. Wikfors and P. Soudant. 2003b. Flow cytometric analysis of haemocytes from eastern oysters, *Crassostrea virginica*, subjected to a sudden temperature elevation II. Haemocyte functions: aggregation, viability, phagocytosis, and respiratory burst. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, **293**: 249-265.
- Hernroth, B. 2003. Factors influencing bactericidal activity of blue mussel (*Mytilus edulis*) haemocytes against *Salmonella typhimurium*. Fish and Shellfish Immunology, **14**: 93-104.
- Hong, X.-T., L.-X. Xiang and J.-Z. Shao. 2006. The immunostimulating effect of bacterial genomic DNA on the innate immune responses of bivalve mussel, *Hyriopsis cumingii* Lea. Fish and Shellfish Immunology, **21**: 357-364.
- Huffman, J. F. and M. R. Tripp. 1982. Cell types and Hydrolytic Enzymes of Soft Shell Clam (*Mya arenaria*) Hemocytes. Journal of Invertebrate Pathology, **40**: 68-74.
- Husmann, G., E. E. R. Philipp, P. Rosenstiel, S. Vazquez and D. Abele. 2011. Immune response of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* to physical stress and microbial exposure. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, **398**: 83-90.
- Kaloyianni, M., S. Dailianis, E. Chrisikopoulou, A. Zannou, S. Koutsogiannaki, D. H. Alamdari, G. Koliakos and V. K. Dimitriadis. 2009. Oxidative effects of inorganic and organic contaminants on haemolymph of mussels. Comparative Biochemistry and Physiology - Part C, **149**: 631-639.
- Lemaire, N., J. Pellerin, M. Fourmer, L. Girault, E. Tamigneaux, S. Cartier and E. Pelletier. 2006. Seasonal variations of physiological parameters in the blue mussel *Mytilus* spp. from farm sites of eastern Quebec. Aquaculture, **261**: 729-751.

- Li, Y., J. G. Qin, X. Li and K. Benkendorff. 2009. Monthly variation of condition index, energy reserves and antibacterial activity in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in Stansbury (South Australia). Aquaculture. **286**: 64-71.
- Livingstone, D. R., F. Lips, P. Garcia Martinez and R. K. Pipe. 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. Marine Biology. **112**: 265-276.
- M'Ber, M., H. Debray, D. A. and P.-H. E. 1988. Distribution and nature of membrane receptors for different plant lectins in the coelomocyte subpopulations of the annelida *Nereis diversicolor*. Developmental and Comparative Immunology. **12**: 1-15.
- Malagoli, D., L. Casarini, S. Sacchi and E. Ottavini. 2007. Stress and immune response in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Fish and Shellfish Immunology. **23**: 171-177.
- Marrone, B. L. 2009. Flow Cytometry: A Multipurpose Technology for a Wide Spectrum of Global Biosecurity Applications. Journal of the Association for Laboratory Automation. **14**: 148-156.
- Matsui, M., J. H. Fowler and L. L. Walling. 2006. Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. Biological Chemistry. **387**: 1535-1544.
- McCord, J. M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. Journal of biological chemistry. **244**: 6049-6055.
- Michiels, C. and J. Remacle. 1988. Use of inhibition of enzymatic antioxidant systems in order to evaluate their physiological importance. European Journal of Biochemistry. **177**: 435-441.
- Mitta, G., F. Vandenbulcke, F. Hubert and P. Roch. 1999. Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge. Journal of Cell Science. **112**: 4233-4242.
- Moore, M. N. and D. M. Lowe. 1977. The cytology and cytochemistry of the hemocyte *Mytilus edulis* and their response to experimentally injected carbon particles. Journal of Invertebrate Pathology. **29**: 18-30.
- Mullainadhan, P. and L. Renwranz. 1985. Lectin-dependent recognition of foreign cells by hemocytes of the mussel, *Mytilus edulis*. Immunobiology. **171**: 263-273.

- Munoz, P., J. Meseguer and M. A. Esteban. 2006. Phenoloxidase activity in three commercial bivalve species. Changes due to natural infestation with *Perkinsus atlanticus*. Fish and Shellfish Immunology. **20**: 12-19.
- Myrand, B. 1999. Reproduction et mortalité estivale chez les moules d'élevage, Thèse de doctorat remise au département de biologie, Faculté des sciences et de génie de l'université Laval, Québec.
- Myrand, B., H. Guderley and J. H. Himmelman. 2000. Reproduction and summer mortality of blue mussels *Mytilus edulis* in the Magdalen Islands, southern Gulf of St. Lawrence. Marine Ecology Progress Series. **197**: 193-207.
- Noël, D., E. Bachère and E. Mialhe. 1994. Phagocytosis associated chemiluminescence of hemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia). Developmental and Comparative Immunology. **17**: 483-493.
- Parisi, M.-G., H. Li, L. B. P. Jouvett, E. A. Dyrinda, N. Parrinello, M. Cammarata and P. Roch. 2008. Differential involvement of mussel hemocyte sub-populations in the clearance of bacteria. Fish and Shellfish Immunology. **25**: 834-840.
- Pipe, R. K. 1990a. Differential binding of lectin hemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. Cell Tissue Research. **261**: 261-268.
- Pipe, R. K. 1990b. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. Histochemical Journal. **22**: 595-603.
- Pipe, R. K. 1992. Generation of Reactive Oxygen Metabolites by the Haemocytes of the Mussel *Mytilus edulis*. Developmental and Comparative Immunology. **16**: 111-122.
- Pipe, R. K., S. R. Farley and J. A. Coles. 1997. The separation and characterisation of haemocytes from the mussel *Mytilus edulis*. Cell Tissue Research. **289**: 537-545.
- Pipe, R. K., J. A. Coles, M. E. Thomas, V. U. Fossato and A. L. Pulsford. 1995. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon Aquatic Toxicology. **32**: 59-73.
- Pipe, R. K., C. Porte and D. R. Livingstone. 1993. Antioxidant enzymes associated with the blood cells and haemolymph of the mussel *Mytilus edulis*. Fish and Shellfish Immunology. **3**: 221-233.

- Renwranzt, L., J. Daniels and P.-D. Hansen. 1985. Lectin-binding to hemocytes of *Mytilus edulis*. Developmental and Comparative Immunology. **9**: 203-210.
- Renwranzt, L. and A. Lam. 2009. Soluble and surface-bound aminopeptidase in eosinophilic blood cells from *Mytilus edulis*. Journal of Invertebrate Pathology. **103**: 68-70.
- Ribera, D., J. F. Narbonne, M. Daubeze and X. Michel. 1989. Characterisation, tissue distribution and sexual differences of some parameters related to lipid peroxidation in mussels. Marine Environmental Research. **28**: 279-283.
- Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. Aquaculture. **172**: 125-145.
- Santarem, M. M., J. A. F. Robledo and A. Figueras. 1994. Seasonal changes in hemocytes and serum defense factors in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis*. Diseases of Aquatic Organisms. **18**: 217-222.
- Soletchnik, P., M. Ropert, J. Mazurié, P. Glidas Fleury and F. Le Coz. 2007. Relationships between oyster mortality patterns and environmental data from monitoring databases along the coasts of France. Aquaculture. **271**: 384-400.
- Somero, G. N. and J. J. Childress. 1990. Scaling ATP-supplying enzymes, myofibrillar proteins and buffering capacity in fish muscle: relationship to locomotory habit. Journal of Experimental Biology. **149**: 319-333.
- Thompson, R. J. 1977. Blood Chemistry, Biochemical Composition, and the Annual Reproductive Cycle in the Giant Scallop, *Placopecten magellanicus*, from Southeast Newfoundland Journal of the Fisheries Research Board of Canada. **34**: 2089-2103.
- Travers, M. A., N. Le Goïc, S. Huchette, M. Koken and C. Paillard. 2008. Summer immune depression associated with increased susceptibility of the European abalone, *Haliotis tuberculata* to *Vibrio harveyi* infection. Fish and Shellfish Immunology. **25**: 800-808.
- Tunkijjanukij, S. and J. A. Olafsen. 1998. Sialic acid-binding lectin with antibacterial activity from the horse mussel: further characterization and immunolocalization. Developmental and Comparative Immunology. **22**: 139-150.

- Underwood, A. J. 1997. Experiments in ecology : their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge University Press, United Kingdom. 524 p.
- Winston, G. W., M. N. Moore, M. A. Kirchin and C. Soverchia. 1996. Production of reactive oxygen species by hemocytes from the marine mussel, *Mytilus edulis*: lysosomal localization and effect of xenobiotics. Comparative Biochemistry and Physiology - Part C. **113**: 221-229.
- Xue, Q. and T. Renault. 2001. Monoclonal antibodies to European flat oyster *Ostrea edulis* hemocytes: characterization and tissue distribution of granulocytes in adult and developing animals. Developmental and Comparative Immunology. **25**: 187-194.
- Yue, X., B. Liu and L. Sun. 2011. Isolation and characterization of a virulent *Vibrio* sp. bacterium from clams (*Meretrix meretrix*) with mass mortality." Journal of Invertebrate Pathology. **106**: 242-249.
- Zhang, Z., X. Li, M. Vandeppeer and W. Zhao. 2006. Effects of water temperature and air exposure on the lysosomal membrane stability of hemocytes in pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). Aquaculture. **256**: 502-509.

